

P03

**Diagnostika některých
dalších grampozitivních
bakterií (enterokoků,
listerií, korynebakterií a
bacilů)**

Osnova

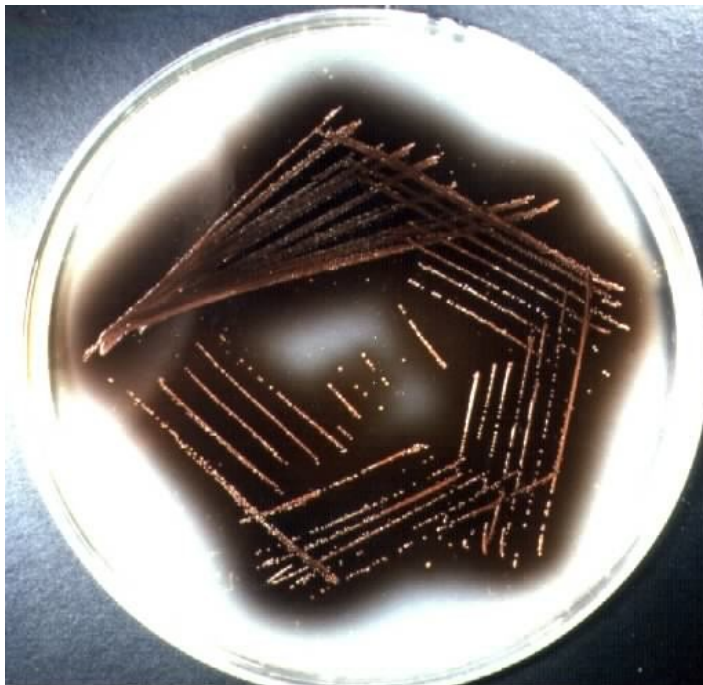
- rod *Enterococcus*
- G+ tyčky
- diagnostika enterokoků a G+ tyček
- úkoly

Rod *Enterococcus*

- **G+ koky**, ve dvojicích nebo krátkých řetězcích
- **fakultativně anaerobní, KAT-, OXI-**
- **vysoce odolné: až 6,5 % NaCl, 40 % žluči, azid sodný (půda Slanetz-Bartley), pH 4,8 až 11, půlhodinové zahřátí na 60 °C, primární rezistence na cefalosporiny**
- součástí **normální mikroflóry střeva**
- **původci močových infekcí**, nozokomiální kmeny jsou často rezistentní (bakteriémie, katetrové sepse, meningitidy, endokarditidy, inf. žlučových cest, ...)
- ***E. faecalis* (90 %), *E. faecium* (5–10 %)**
- **VRE** – vankomycin rezistentní enterokoky

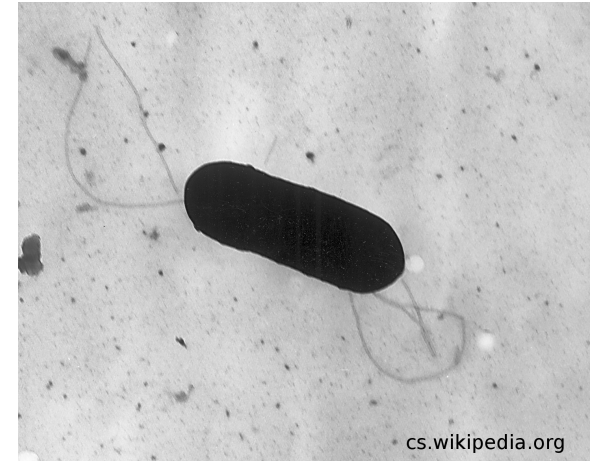
Rod *Enterococcus* (2)

- **G+ koky**, dvojice, řetízky
- **žluč eskulinový agar** (tmavě hnědé až černé drobné kolonie nebo zbarvují dvorec kultivační půdy černě)
- **půda Slanetz-Bartley** (růžové až červené kolonie)



Rod *Listeria*

- **G+** tyčky, krátké,
- **fakultativně anaerobní, KAT+**
- **odolné** (růst při vyšších koncentracích **NaCl** nebo **žlučových solí, růst při nízkých teplotách**)
- ***L. monocytogenes*** (listeriόza), ***L. ivanovi*** (listeriόza ovcí)
- **listeriόza:**
 - nejčastěji **alimentární infekce** (nedostatečně pasterované mléko, sýry, krůtí a drůbeží maso, zelenina)
 - **nejčastěji probíhá bezpříznakově**, popř. nevolnost, zvracení, průjem



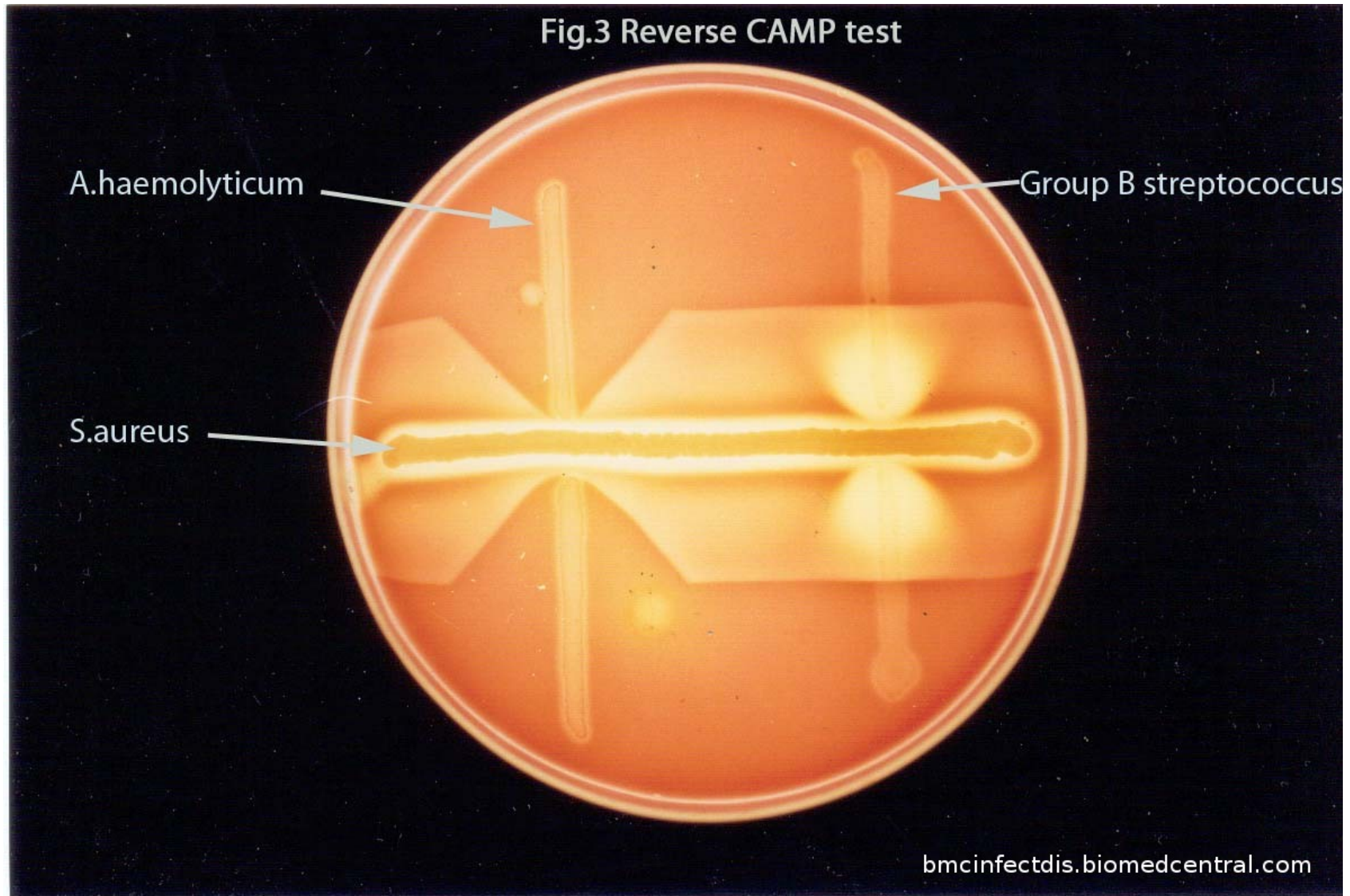
Rod *Listeria* (2)

- **listeri3za:**
 - **nejnebezpe4n4jší u oslaben4ých jedinců** (nemoc, st4ří, gravidita)
 - infekce ran, meningitida, meningoencephalitida nebo encefalitidami dosp4l4ých
 - **infekce placenty**, plodov4ých obalů a celkové generalizované **onemocn4ní plodu** prov4zen4ho **sepsí**
 - **potraty** ve druh4m a t4rtím trimestru, narození mrtv4ých nebo t4žce nemocn4ých novorozenců (umírají brzy po porodu)

Koryneformní tyčky („difteroidy“)

- termín používaný zpravidla pro **nesporulující G+ tyčky, kyjovitého tvaru**, někdy rovné či zahnuté
- v minulosti všechny v rodu *Corynebacterium*
- vytvořeny nové rody (*Arcanobacterium*, *Rhodococcus*, *Dermatophilus*, *Turicella*, ...)
- *Arcanobacterium haemolyticum* – tonsilitidy, infekce ran; KAT-, reverzní CAMP test
- *Rhodococcus equi* – infekce imunokompromitovaných pacientů (transplantace, AIDS)

Reverzní CAMP test



Rod *Corynebacterium*

- **G+** nesporeující tyčky kyjovitého tvaru, někdy pleomorfní
- typické uspořádání v **palisádách** a tzv. **havraních křídlech**
- fakultativně anaerobní, **půdy s teluričitanem**
- **odolné** k vyschnutí a NaCl, nerostou na agaru bez přídavku krve
- ***Corynebacterium diphtheriae***
- **nedifterická** (=nezáškrťová) **korynebakteria** (součást mikroflóry kůže)



Corynebacterium diphtheriae

- původce **záškrtu** (diftérie)
- **difterický toxin** (nezbytná přítomnost genu *tox*, přenášený β -bakteriofágem, ireverzibilně blokuje proteosyntézu → zánik infikované buňky)
- **pseudomembrána z fibrinu**, pod níž jsou bakterie produkující toxin → nekróza okolních buněk
- **pseudomembrány vznikající ve sliznici HCD** mohou vést k jejich **mechanické obstrukci**, edému sliznice a následně k **udušení**
- **akutní infekce léčena podáním antitoxinů**
- **prevence očkováním (hexavakcína)**

Corynebacterium diphtheriae (2)



pseudomembrána



masivní zvětšení krčních uzlin u diftérie

Nedifterická korynebakteria

- **součástí běžné mikroflóry kůže**
- infekce ran, katérové sepse, postihují vnitřní orgány při průniku do organismu
- ***Corynebacterium jejkeium***:
 - dříve „korynebakterium skupiny JK“
 - **nozokomiální infekce** (až 40 % hospitalizovaných pacientů, zřídka na kůži zdravých jedinců)
 - **katérové sepse**, polyrezistence
- *Corynebacterium pseudotuberculosis* – lymfadenitidy, pneumonie, záněty kůže
- *Corynebacterium urealyticum* – pyelonefritidy, cystitidy

Rod *Bacillus*

- **G+ tyčky, robustní, rovné až konkávní konce**, tvoří **endospory**, často pohyblivé, obvykle KAT+
- většina zástupců běžně přítomna v prostředí (tvorba endospor)
- v klinickém prostředí **časté kontaminace**
- podle **morfologie spor** rozdělení do tří skupin:
 - oválné spory, nevyklenují buňku (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, ...)
 - oválné spory, vyklenují buňku (*G. stearothermophilus*, *B. polymyxa*, ...)
 - sférické spory, vyklenují buňku (*B. sphaericus*)

Rod *Bacillus* (2)

- rozdělení dle **morfologie endospor**:



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



ex : *B. Polyxyma* (fixe le N₂)



ex : *B. Pasteurii* (dégrade l'Urée)

Bacillus anthracis

- **obligátní patogen, původce anthraxu** (sněť slezinná, uhlák)
- **plicní anthrax**: spory pronikají do plicních alveolů → makrofágy do mediastinálních uzlin (zpočátku připomíná chřipkovité onemocnění) → hemoragická nekróza uzlin a bakteriémie → septický šok a respirační selhání; bez včasného podání ATB letalita až 100 %
- **kožní anthrax**: papula v místě vstupu → vřed se silným edémem a hemoragickou nekrózou v centru → regionální lymfadenitida → sepse u neléčení infekce
- **střevní anthrax**: nauzea, zvracení, horečka, bolesti břicha, krvavé průjmy → sepse; letalita až 50 %
- **lékem volby jsou penicilinová ATB**

Další druhy rodu *Bacillus*

- ***B. cereus*** – součástí střevní mikroflóry, alimentární enterotoxikózy při přemnožení; devastující infekce oka
- ***B. subtilis*, *Geobacillus*** (dříve *Bacillus*)
stearothermophilus – spory přežívají vysoké teploty, indikátory účinnosti sterilizátorů

Léčba infekcí způsobených enterokoky a G+ tyčkami

- **enterokoky a listerie rezistentní na cefalosporiny**
- ***E. faecalis* ampicilin, *E. faecium* je k ampicilinu primárně rezistentní**
- ko-trimoxazol, doxycyklin, jako rezerva vankomycin
- **vankomycin rezistentní kmeny (VRE)**
 - zejména u hematoonkologických pacientů
 - **linezolid** (oxazolidinony, inhibice proteosyntézy)
 - **quinupristin/dalfopristin** (streptograminy, inhibice proteosyntézy)

Enterokoky a G+ tyčky: přehled kultivace a mikroskopie

	Enterokoky	Listerie	Koryneform.	<i>Bacillus</i>
Mikroskopie	G+ koky v krátkých řetízcích	G+ tyčky, mohou tvořit řetízky či palisády	G+ tyčky skládající se vedle sebe (palisády, „havraní křídla“)	G+ robustní tyčky, sporulující (nemusí být viditelné)
Kultivace	šedavé, velké asi jako <i>S.</i> <i>agalactiae</i> , většinou bez hemolýzy, ale i s virid. či hemol.	podobné entero- kokům, hemolýza je či není	velmi drobné kolonie (podobné mouce)	plstovité kolonie, někdy i výrazná hemolýza

Diagnostika enterokoků

- **biochemické testy: KAT-**, štěpení arabinosy (*E. faecalis* neštěpí, půda je **zelená**, *E. faecium* štěpí, **žlutá**), ENCOCCUStest
- **antigenní analýza**: zpravidla se nepoužívá (dle Lancefieldové antigenní **skupina D**)
- **citlivost** lze testovat na běžném **MH agaru** bez krve
- **speciální půdy na skrínig VRE**

Diferenciální diagnostika enterokoků

- **Gramovo barvení:** grampozitivní koky, grampozitivní tyčinky a ostatní bakterie
- **stafylokoky:** **KAT+**, růst na agaru s 10 % NaCl
- **streptokoky:** nepřítomnost růstu na Slanetz-Bartleyho či žluč-eskulinové půdě, popř. PYR testem (kromě *S. pyogenes* negativní)
- **enterokoky:** **růst na Slanetz-Bartleyho či žluč-eskulinové půdě**, PYR test pozitivní
- vzájemné rozlišení enterokoků arabinózovým testem nebo složitějším ENCOCCUS testem

Diagnostika G+ tyček

- **biochemické testy: KAT+** (*Arcanobacterium* KAT–), biochemicky lze rozlišovat koryneformní tyčinky navzájem (API Coryne, Remel)
- **růst při nízkých teplotách**, vysokých koncentracích NaCl a hemolytické interakce se používají v diagnostice **listerií**
- **průkaz antigenu** – např. **průkaz difterického toxinu Elekovým testem**

Diferenciální diagnostika G+ tyček

- **u G+ tyčinek ale není jednoznačný algoritmus!**
- **Gramovo barvení:** odliší grampozitivní tyčinky od ostatních (bacily robustní tyčky, často tvorba endospor)
- bacily kultivačně charakteristické (velké plstovité kolonie)
- druhové určení je možné biochemickými testy, testy citlivosti na antibiotika apod.
- **pokud tyčky nesporulují a nejsou robustní,** mělo by jít o **listerie** nebo některou z **koryneformních tyček** (samotná nepřítomnost endospory není důkaz!)
- **další rozlišení je možné biochemicky, růstem** při různých teplotách, testy **hemolytických interakcí** (synergismů, antagonismů) apod.

Úkol 1: Mikroskopie kmenů

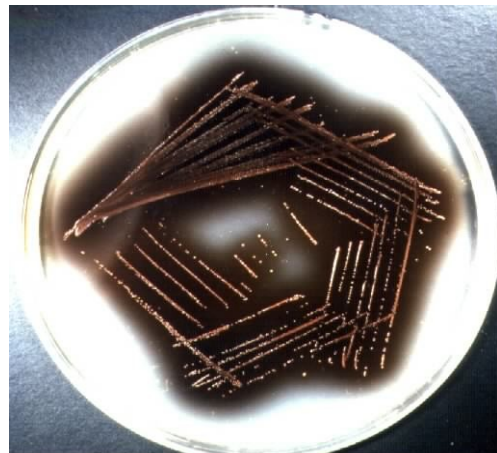
- obarvete podle Grama osm kmenů
- **G+ koky, G+ tyčky, jeden kmen G– tyčka**
- ***Bacillus*** – **robustní tyčinky**, někdy s nálezem centrálně až subterminálně uložených **endospór**, jež mohou, ale nemusí vyklenovat tyčku
- ***Listeria*** – mikroskopicky drobnější než *Bacillus*, **neuspořádané v palisádách**, ale spíše v krátkých řetízcích
- ***Corynebacterium*** – kyjovité, uspořádané do palisád či „havraních křídel“

Úkol 2: Morfologie kolonií G+ koků a tyčinek

- **popište kolonie, odhadněte rody bakterií**
- ***Bacillus*** – **velké**, ploché, suché, **plst'ovité kolonie**, „rozlézající“ se po povrchu agaru, někdy s výraznou hemolýzou, jindy zcela bez ní
- ***Listeria*** – **bezbarvé až naředlé kolonie**, velmi podobné enterokokovým, bez hemolýzy nebo s hemolýzou
- ***Corynebacterium*** (a blízké rody) – šedavé nebo bělavé kolonie podobné stafylokokovým, ale někdy i o hodně menší, většinou bez hemolýzy

Úkol 3: Některé běžné biochemické a kulturační testy

- **úkol 3a: katalázový test** (*Listeria*, *Corynebacterium* i *Bacillus* pozitivní)
- **úkol 3b: růst na Slanetz-Bartleyho půdě** (pro enterokoky, pozitivní jsou ty, které nejen rostou, ale navíc mají typickou růžovou až červenohnědou barvu)
- **úkol 3c: růst na žluč-eskulinové půdě** (pro enterokoky a listerie, pozitivní jsou černé kolonie)



Úkol 4: Vzájemné rozlišení enterokoků

- **úkol 4a: arabinózový test** pro druhové rozlišení dvou nejběžnějších druhů enterokoků (*E. faecalis* neštěpí, půda je **zelená**, *E. faecium* štěpí, **žlutá**)
- **úkol 4b: ENCOCCUStest** (vyhodnoťte podle návodu, pouze 8 reakcí, neurčujte index typičnosti a % pravděpodobnosti)

Úkol 5: Další metody k diagnostice listerií

- **úkol 5a: růst listerií při 4 °C (listerie je schopna růst při nízkých teplotách; některé druhy yersinií a pseudomonád také.)**
- **úkol 5b: demonstrace růstu *Listeria monocytogenes* na chromogenní půdě (půda ALOA, modré zbarvení všech kolonií listerií, přičemž patogenní druhy navíc mají kolem sebe halo (odlišně zbarvené okolí kolonie).**

Úkol 5b: Chromogenní půda ALOA



modré zbarvení všech kolonií listerií, **patogenní druhy mají kolem sebe halo**

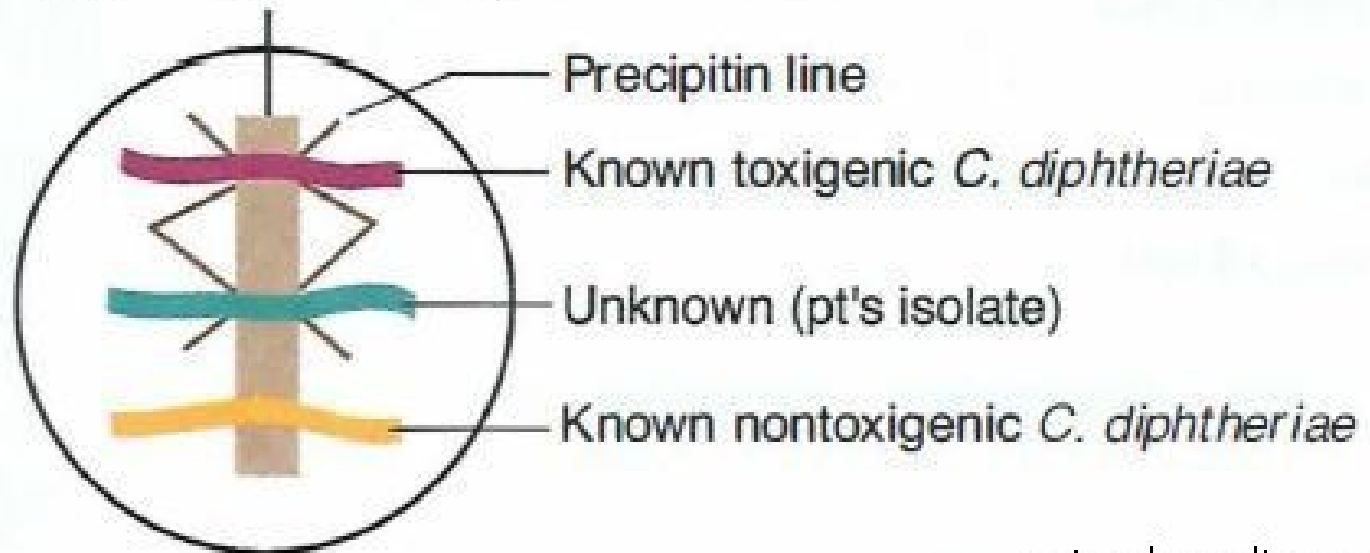
Úkol 6: Vztah enterokoků a G+ tyčinek k antibiotikům

- **úkol 6a:** odečtíte diskový difuzní test
- **úkol 6b:** demonstrace testu citlivosti u kmene *Enterococcus faecium* (k ampicilinu primárně rezistentní)
- **úkol 6c:** demonstrace kmene VRE

Úkol 7: Demontrace Elekova testu

- **precipitace mezi toxinem** z toxického kmene a **antitoxinem** z papírového proužku napuštěného antisérem

Filter paper strip with *C. diphtheriae* antitoxin



microbeonline.com

Po tomto cvičení byste měli umět:

- popsat zástupce rodu *Enterococcus* a hlavní klinicky významné G+ tyčky, vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- diskutovat význam VRE, jejich diagnostické a terapeutické možnosti
- obecně vysvětlit princip a význam precipitace v agaru a popsat Elekův test

Nadpis

- text