



## **STREPTOKOKY DALŠÍ G+ BAKTERIE**

Lékařská mikrobiologie – cvičení  
Mikrobiologický ústav LF MU

# Z minulých cvičení byste měli znát

---

- ▶ Klinický význam stafylokoků
- ▶ Odlišení *S.aureus* od CoNS
- ▶ Význam a detekce koagulázy a hyaluronidázy
- ▶ MRSA



# Přehled G+ bakterií

---

Cvičení	Tvar	Zástupci
P01	koky	Stafylokoky ( <i>S.aureus</i> , CoNS)
P02	koky	Streptokoky (viridující, hemolytické)
P03	koky	Enterokoky
	tyčky	Listerie, Bacily, Korynebakteria

Listerie a korynebakteria nesporulují, bacily sporulují.



# Obsah cvičení

---

- ▶ Charakteristika streptokoků
- ▶ Streptokokové infekce a jejich léčba
- ▶ Diagnostika streptokoků
- ▶ Charakteristika enterokoků
- ▶ Charakteristika G+ tyčinek
- ▶ Léčba infekcí způsobených enterokoky a G+ tyčinkami
- ▶ Diagnostika enterokoků a G+ tyčinek
- ▶ Praktické úkoly



# Rod *Streptococcus*

---

- ▶ G+ koky, často tvoří dvojice nebo řetízky, nepohyblivé
- ▶ Kataláza negativní (rod *Staphylococcus* kataláza pozitivní), oxidáza negativní
- ▶ Kultivace na krevním agaru → hemolyzují erytrocyty.
- ▶ Dělení dle typu hemolýzy:
  - $\alpha$  – viridující
  - $\beta$  – hemolitické
  - $\gamma$  – nehemolytické
- ▶ Dělení dle Lancefieldové: antigenní skupiny, nejčastěji A, B, C, E, F, G, H, ... (skup. D – dnes enterokoky, *S. bovis*)



# Přehled streptokoků

---

Typ hemolýzy	Zástupci
$\alpha$ -hemolýza (viridace)	Streptococcus pneumoniae skupina "ústních streptokoků"
$\beta$ -hemolýza	Streptococcus pyogenes (sk. A dle Lancefieldové) Streptococcus agalactiae (sk. B dle Lancefieldové) skupina "non-A-non-B" streptokoků
$\gamma$ -hemolýza (žádná)	streptokoky bez hemolýzy



# *Streptococcus pyogenes*

- ▶ Patří do **skupiny A** dle Lancefieldové
- ▶ **Úplná  $\beta$ -hemolýza**, roste v drobných koloniích
- ▶ **Diagnostika:** PYR test, bacitracinový test



- ▶ **Onemocnění:** akutní tonsilitida (angína), hnisavé záněty měkkých tkání (nekrotizující fasciitis), spála, erysipel (tzv. růže), flegmóny (neohraničené záněty), pneumonie, meningitidy, sepse.
- ▶ **Pozdní následky streptokokových infekcí:** revmatická horečka, akutní glomerulonefritida → detekce pomocí serologické metody **ASLO**.

# Akutní tonsilitida (angína)

---

- ▶ Nejčastějším bakteriálním původcem je ***S. pyogenes***.
- ▶ **Dalšími možnými původci jsou:** *S. pneumoniae*, stafylokoky, hemofily, **virové:** virus chřipky, herpes viry, EBV, ...





# Spála (scarlatina)

---

- ▶ Angína s exantémem a projevy na sliznici (petechie)
- ▶ Produkce **pyrogenního (erytrogenního) toxinu**



# Erysipel (růže)

---

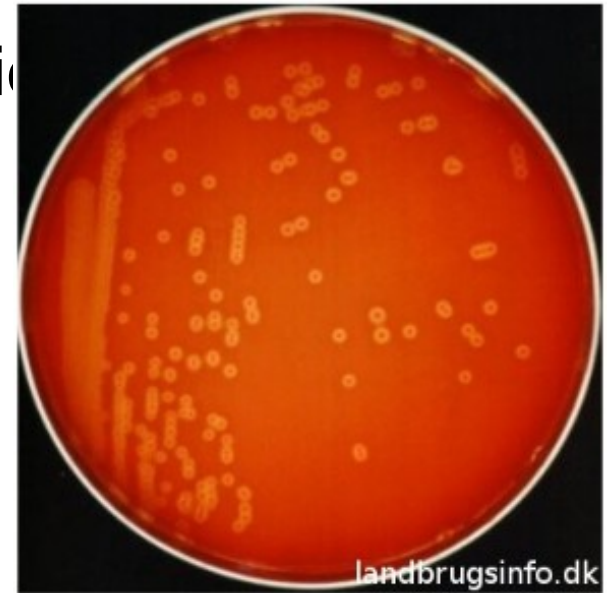
- ▶ Ostře ohraničený zánět, nejčastěji v oblasti bérců a v obličeji
- ▶ Infekce kůže se šíří do kožních lymfatických cév, při



# *Streptococcus agalactiae*

---

- ▶ Patří do **skupiny B** dle Lancefieldové
- ▶ **Neúplná  $\beta$ -hemolýza**, větší kolonie
- ▶ **Diagnostika:** Pozitivní CAMP test



- ▶ **Onemocnění:** původce močových infekcí (u žen v urogenitálním traktu a GIT), infekce novorozenců (sepsy, pneumonie, meningitidy), infekce gravidních žen

# „non-A-non-B“ streptokoky

---

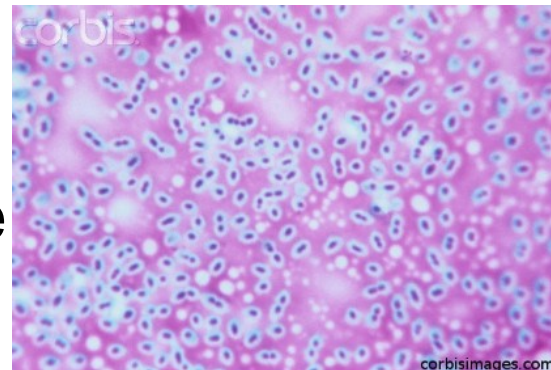
- ▶ **β-hemolýza**, ale nepatří ani do skupina A (*S. pyogenes*) ani do skupiny B (*S. agalactiae*)
- ▶ **Onemocnění**: faryngitidy (záněty hltanu), často přítomny bez klinických projevů
- ▶ **Zástupci**: *S. dysgalactiae*, *S. equi*
- ▶ **Diagnostika**: obvykle se neurčují, v případě potřeby se blíže identifikují průkazem antigenu



# ***Streptococcus pneumoniae***

---

- ▶ „pneumokok“, dříve Diplococcus pneumoniae
- ▶ **Netvoří řetízky**, ale pouze dvojice, tvar buněk je lancetovitý
- ▶  **$\alpha$ -hemolýza**, opouzdřené buňky mají hlenovité kolonie (kapky oleje)
- ▶ V R-fázi netvoří pouzdro
- ▶ V malém množství se vyskytuje i u zdravých osob
- ▶ **Onemocnění:** sinusitidy, pneumonie, otitis media, meningitidy, sepse, endokarditidy
- ▶ Nepovinné očkování (Pneumo23, Prevenar13, Synflorix)



# Skupina „ústních“ streptokoků

---

- ▶ Jinak také **alfa streptokoky** nebo **viridující streptokoky** (obvykle  $\alpha$ -hemolytické streptokoky, kromě pneumokoka)
- ▶ Vyskytují se jako **normální součástí mikroflóry ústní dutiny** a částečně i faryngu
- ▶ Fyziologicky se neustále dostávají v malém množství do krve (ve velkém množství způsobují subakutní bakteriální endokarditidy – adherují na poškozené srdeční chlopně) -  
→ vzniká útvar na chlopni = „vegetace“ - forma biofilmu (matrix tvoří krevní destičky a fibrin)
- ▶ ***S. mutans*** – **zubní kaz** (nejrychleji tvoří org. kyseliny)
- ▶ *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*



# Léčba streptokokových infekcí

---

- ▶ **Lék volby:** penicilin
  - ▶ Při alergiích na PNC – makrolidy
  - ▶ Další možná ATB: doxycyklin, kotrimoxazol, ampicilin, aj.
  - ▶ **Rezervní ATB:** vankomycin
- 
- ▶ Difúzní diskový test se provádí na MH agaru s krvinkami, na běžném MH agaru streptokoky prakticky nerostou





# Diagnostika streptokoků (1)

---

- ▶ **Mikroskopie:** G+ koky
- ▶ **Kultivace:** na KA kolonie šedé až bezbarvé, většinou drobné (vyjma *S. Agalactiae*, který má větší kolonie)
- ▶ **Hemolýza:**  $\alpha$ -  $\beta$ - i  $\gamma$ -hemolýza
- ▶ **Odlišení od ostatních G+:**
  - nerostou na krevním agaru s 10 % NaCl (odlišení od stafylokoků)
  - nerostou na Slanetz-Bartley či žluč-eskulinové půdě (odlišení od enterokoků)
- ▶ Kataláza negativní, oxidáza negativní
- ▶ Rezistentní na aminoglykosidy (stejně jako enterokoky)





# Diagnostika streptokoků (2)

---

- ▶ **Viridující streptokoky (s  $\alpha$ -hemolýzou):** dourčení biochemicky, především u nálezů z likvoru nebo hemokultur
- ▶ **Streptokoky s  $\beta$ - a  $\gamma$ -hemolýzou** – mají slabou biochemickou aktivitu, lze je tedy dále dourčit např. latexovou aglutinací



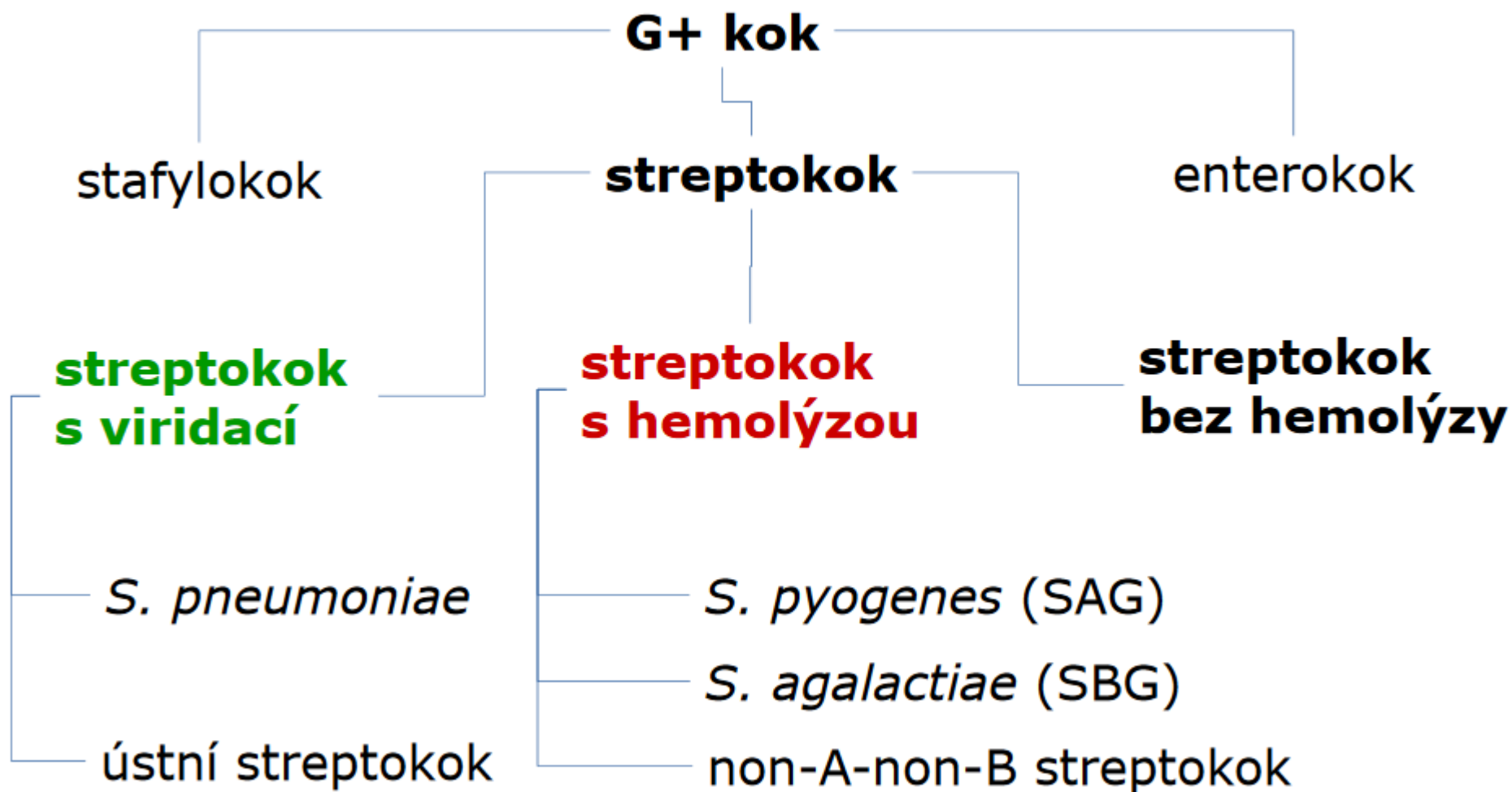
# Diferenciální diagnostika streptokoků (1)

---

- ▶ **Provádí se hodnocení hemolýzy:**
- ▶  **$\beta$ -hemolýza:**
  - *S. pyogenes* (pozitivní PYR test a bacitracinový test)
  - *S. agalactiae* (pozitivní CAMP test)
- ▶  **$\alpha$ -hemolýza:**
  - *S. pneumoniae* (pozitivní optochinový test na rozdíl od ostatních viridujících streptokoků)

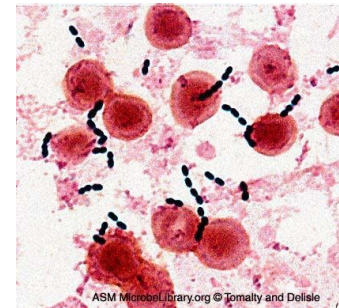


## Diferenciální diagnostika streptokoků (2)



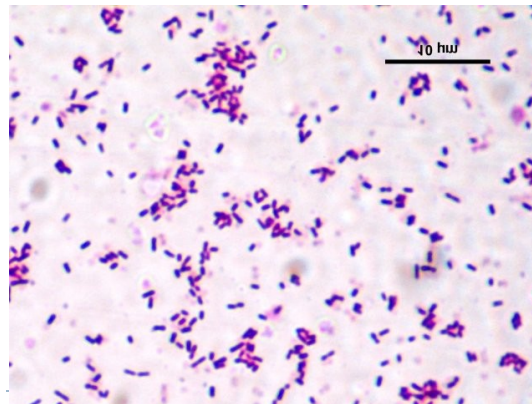
# Charakteristika enterokoků

- ▶ G+ koky v drobných shlucích či krátkých řetězcích
- ▶ Vysoká odolnost – 6,5 % NaCl (pozor – stafylokoky až 10 % NaCl!), žluč, azid sodný, pH 4,8 - 11
- ▶ Kataláza NEG
- ▶ **Klinický význam:**
  - Součást normální mikroflóry střeva
  - Jedni z nejběžnějších původců **močových infekcí**
  - Nozokomiální infekce (rány, sepse, endokarditidy, implantáty, atd.)
- ▶ Primární **rezistence k cefalosporinům**
- ▶ *E. faecalis* (90%), *E. faecium* a další
- ▶ Nebezpečné **VRE** – vankomycin rezistentní enterokoky



# Charakteristika G+ tyčinek - listerie

- ▶ G+ krátké tyčinky
- ▶ **Výskyt:** v prostředí a potravinách (mléko, sýry, zelenina, maso, půda, listí...),
- ▶ Vysoká odolnost - růst při nízkých teplotách (4 °C – lednička, sýrárny) a vysokých koncentracích NaCl či žluči
- ▶ Kataláza POZ
- ▶ *L. monocytogenes*, *L. ivanovi*, *L. innocua* aj.



# Charakteristika G+ tyčinek - listerie

---

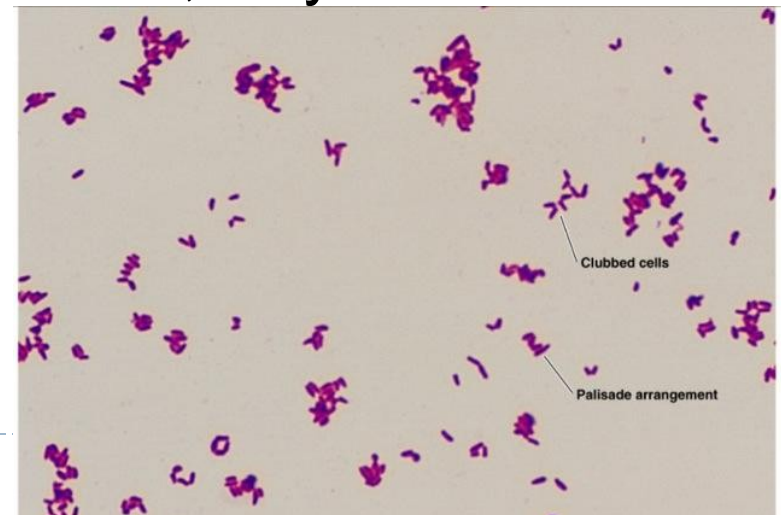
## ► Klinický význam:

- **Listerióza** - gastroenteritida, horečnaté onemocnění, málokdy infekce u zdravých dospělých
- Riziko pro **těhotné** - hrozí kongenitální infekce plodu přes placentu (možný potrat) nebo (ve třetím trimestru) infekce plodu, nebo také perinatální infekce při porodu (kontaminovaný poševní sekrete).
- **Novorozenci** - typická meningitida či sepse (málo časté, vysoká letalita)
- Lidé s **oslabenou imunitou** – infekce ran, sepse, meningitidy



# Charakteristika G+ tyčinek - korynebakteria

- ▶ Korynebakteria jsou grampozitivní tyčinky **kyjovitého** tvaru (koryné = kyj), některá **pleomorfní**, mohou být **gramlabilní**.
- ▶ Odolné k vyschnutí a koncentraci NaCl, ale **nerostou na MH agaru bez krve**. Tvoří palisády a tzv. havraní křídla.
- ▶ Kataláza POZ
- ▶ *Corynebacterium diphtheria* – záškrť, díky očkování vzácný
- ▶ Nedifterická (= nezáškrťová) korynebakteria – součástí běžné mikroflóry kůže.



# Charakteristika G+ tyčinek - korynebakteria

## ► Klinický význam:

- **Záškrť** - pseudomembranózní angina (pablány, otok). Vznik pouze pokud kmen bakterie produkuje **difterický toxin** (ten do buňky vnáší tzv.  $\beta$ -fág). Charakteristický oteklý krk, při absenci terapie smrt udušením.

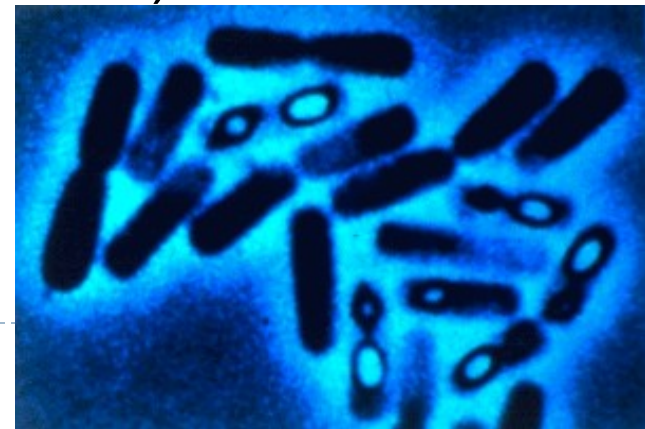




# Charakteristika G+ tyčinek - bacily

---

- ▶ G+ mohutné tyčinky s rovnými konci
- ▶ Pohyblivé, sporulující - jedna **endospora** (terminální, subterminální či centrální)
- ▶ Kataláza POZ
- ▶ Většina zástupců – neškodné mikroby vnějšího prostředí.
- ▶ **V klinice většinou kontaminace.**
- ▶ Několik významných zástupců – *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Geobacillus* (dříve *Bacillus*) *stearothermophilus* a *Bacillus subtilis*



# Charakteristika G+ tyčinek - bacily

---

## ► Klinický význam:

- ***Bacillus anthracis*** - obligátní patogen, původce veterinárního onemocnění – **antraxu** – potenciál biologické zbraně. Jedna z prvních nákaz, na kterých byla zkoušena vakcinace.
- ***Bacillus cereus*** – enterotoxikózy, infekce oka. Imunokompromitované osoby - infekce ran, endokarditidy, sepse.
- ***Geobacillus stearothermophilus* a *Bacillus subtilis*** - schopnost přežívat při velmi vysokých teplotách → použití: indikátory účinnosti sterilizátorů.



# Enterokoky a G+ tyčinky: léčba

---

- ▶ Enterokoky a listerie – primární **rezistence na cefalosporin**. Enterokoky také primárně rezistentní na makrolidy, linkosamidy.
- ▶ *E.faecalis* – citlivý na ampicilin, ale *E.faecium* – primárně rezistentní.
- ▶ Možné použití ko-trimoxazolu, doxycyklinu, jako rezerva vankomycin.
- ▶ **VRE** – vankomycin rezistentní kmeny (hlavně u hematologických pacientů) → linezolid (ZYVOXID), případně dalfopristin/quinupristin (SYNERCID).



# Enterokoky a G<sup>+</sup> tyčinky: diagnostika

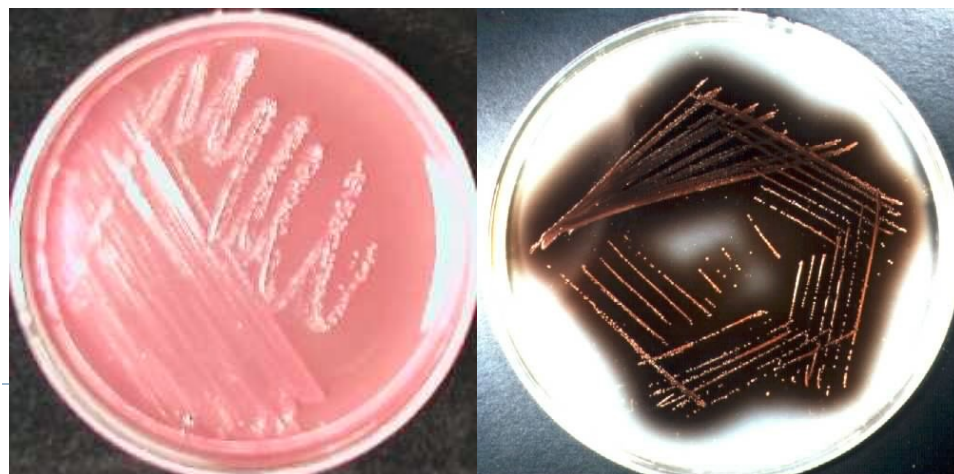
## – přehled kultivace a mikroskopie

	Enterokoky	Listerie	Korynebakteria	Bacily
Mikroskopie	G <sup>+</sup> koky v krátkých řetězcích	G <sup>+</sup> tyčinky řetězí se za sebou, palisády	G <sup>+</sup> tyčinky skládající se vedle sebe jako palisády nebo "havraní křídla"	G <sup>+</sup> robustní tyčinky, možná sporulace
Kultivace	šedavé, většinou bez hemolýzy (ale možná viridace i hemolýza)	podobné enterokokům, hemolýza možná	velmi drobné kolonie (podobné mouce)	plstovité kolonie, někdy výrazná hemolýza

# Diagnostika: enterokoky

---

- ▶ Kataláza NEG
- ▶ Růst na žluč – eskulinové půdě, na Slanetz – Bartleyho agaru.
- ▶ Biochemie – **štěpení arabinosy** (*E. faecalis* neštěpí → půda je **zelená**, *E. faecium* štěpí → půda **žlutá**)
- ▶ Antigenní analýza - zpravidla se nepoužívá.
- ▶ Testy citlivosti – běžný MH agar. Existují i půdy na screening VRE.



# Diagnostika: G+ tyčinky

---

- ▶ Kataláza POZ u všech tří skupin (ale např. u rodu *Arcanobacterium* blízkého korynebakteriím je negativní!)
- ▶ Biochemický rozlišení koryneformních tyčinek navzájem – API Coryne, Remel)
- ▶ Diagnostika listerií – růst při nízkých teplotách, vysokých koncentracích NaCl a hemolytické interakce.
- ▶ Průkaz antigenu – průkaz difterického toxinu **Elekovým testem** (viz. dále).



# Diferenciální diagnostika: enterokoky

---

- ▶ **Gramovo barvení:** grampozitivní koky x grampozitivní tyčinky x ostatní bakterie.
- ▶ Stafylokoky odliší pozitivní **kataláza** a **růst na NaCl** (10 %!).
- ▶ Streptokoky odliší nepřítomnost **růstu na Slanetz – Bartleyho či žluč – eskulinové půdě**, popř. PYR testem (kromě *S. pyogenes* negativní).
- ▶ Vzájemné rozlišení je možné arabinózovým testem nebo složitějším testem – **ENCOCCUS** test – 8 reakcí.



# Diferenciální diagnostika: bacily

---

- ▶ **Gramovo barvení:** grampozitivní koky **x** grampozitivní tyčinky **x** ostatní bakterie.
- ▶ Bacily se navíc projeví už v Gramově barvení coby **velmi rozměrné (robustní) tyčinky**. Často, ale ne vždy, můžeme také pozorovat tvorbu **endospor**.
- ▶ **Kultivace** – velké, plst'ovité kolonie.
- ▶ Druhové určení je možné biochemickými testy, testy citlivosti na antibiotika apod.
- ▶ ***U G+ tyčinek ale není jednoznačný algoritmus!***





# Diferenciální diagnostika: listerie a koryneformní tyčinky

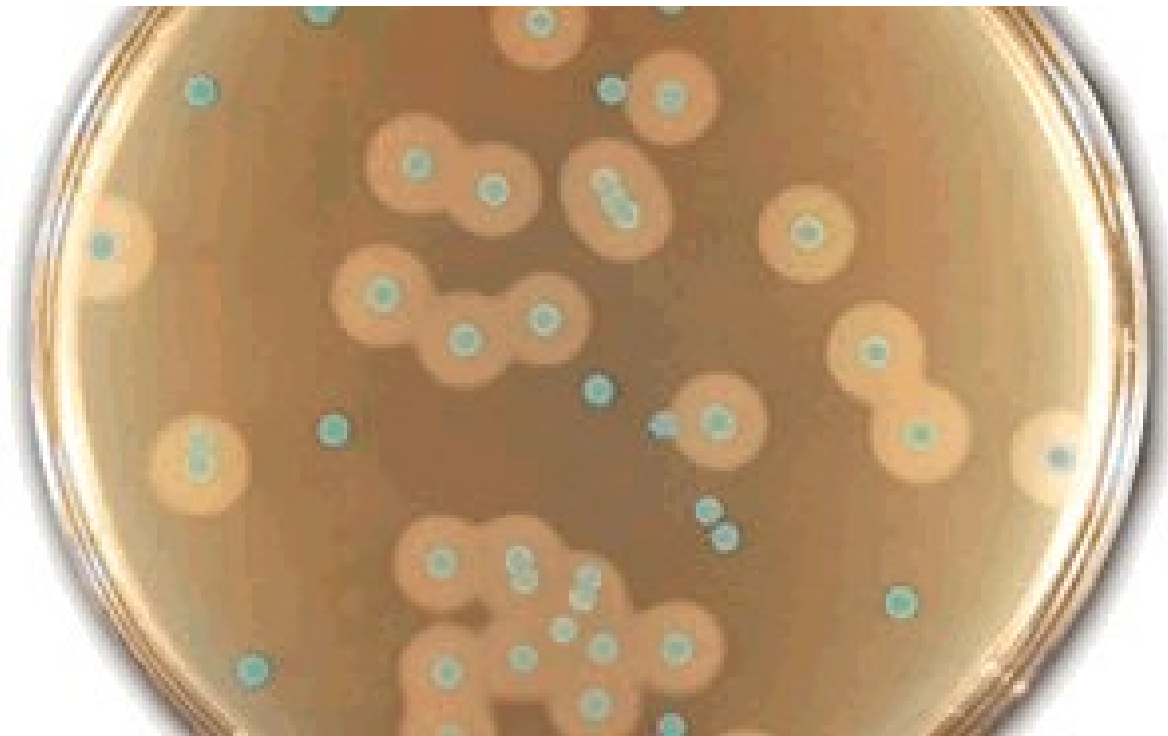
---

- ▶ **Gramovo barvení:** grampozitivní koky x grampozitivní tyčinky x ostatní bakterie.
- ▶ Nesporulují, nejsou robustní – vyloučeny bacily.
- ▶ Spolehlivější dourčení – biochemie, růst při různých teplotách (listerie 4 C), testy hemolytických interakcí.
- ▶ ***U G+ tyčinek ale není jednoznačný algoritmus!***



# Diferenciální diagnostika: listerie

---



- ▶ Chromogenní půda na diagnostiku listerií – ALOA – modré zbarvení kolonií listerií, patogenní druhy mají kolem sebe tzv. HALO = odlišně zbarvené okolí.

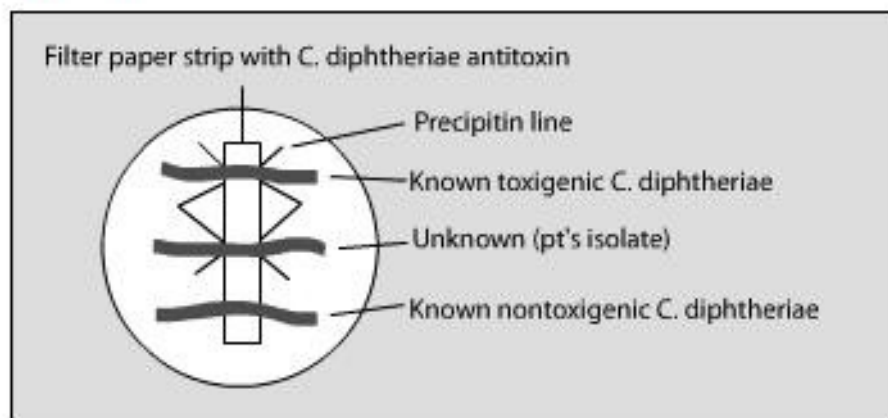


# Diferenciální diagnostika: koryneformní tyčinky

- ▶ Detekce difterického toxinu za použití speciálního papírku s antitoxinem – položen na povrch agaru, kam se posléze očkují testované kmeny.
- ▶ Pozitivní výsledek = precipitační linie.



ELEK test:



# Úkol č. 1 – Gramovo barvení

---

- ▶ Obarvěte podle Grama osm podezřelých kmenů (pro zopakování: natřít → nechat uschnout → fixovat plamenem → poté barvit: Gram 30 s → Lugol 20-30 s → **opláchnout vodou** → alkohol 15-20 s → opláchnout vodou → safranin 60 → opláchnout vodou → **osušit filtračním papírem (nedrhnout buničinou ani ničím jiným!)** → imerzní objektiv - olej)



## Úkol č. 2 – Morfologie kolonií

---

- ▶ **Popište všechny kmeny, které se v úkolu č. 1 barvily jako grampozitivní.** Popište velikost, barvu, tvar, profil a hemolytické vlastnosti. Podle možnosti popište i další (povrch, okraje, konzistence, průhlednost, zápach).
- ▶ Pokuste se odhadnout, který z G<sup>+</sup> koků by mohl být stafylokok (bílý, máslovité kolonie)
- ▶ Pokuste se odhadnout, která z G<sup>+</sup> tyčinek je *Listeria*, *Bacillus* a *Corynebacterium*.



# Úkol č. 3 – Kataláza, ŽE, Slanetz-Bartley

---

- ▶ **3a) Kataláza – enterokoky negativní, G+ tyčinky pozitivní (pozitivní také G+ stafylokok, negativní také G+ streptokok).**
- ▶ **3b) Růst na Slanetz-Bartleyho půdě (přídavek azidu sodného) – rostou enterokoky.**
- ▶ **3c) Růst na žluč-eskulinovém agaru – zde rostou z G+ koků enterokoky a z G+ tyčinek listerie**



# Úkol č. 4 – Odlišení streptokoků s viridací

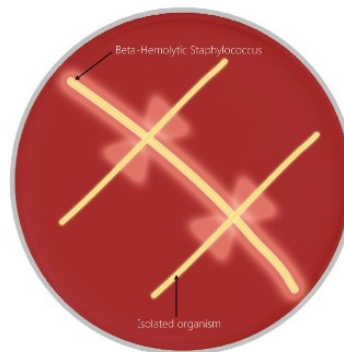
---

- ▶ **4a: Optochinový test:** k odlišení *S. pneumoniae* od ostatních viridujících streptokoků:
  - pneumokok je citlivý k optochinu, neměříme zónu inhibice (optochin se dnes již nepoužívá léčebně, zůstal jen v diagnostice)
  
- ▶ **4b: Biochemické určení „ústního“ streptokoka** – STREPTOtest 16 (17 reakcí: 1. je VPT, 2. až 9. jsou v prvním řádku, 10. až 17. jsou ve druhém řádku) → velice podobné STAPHYTESTu 16 – dnes neprovádíme

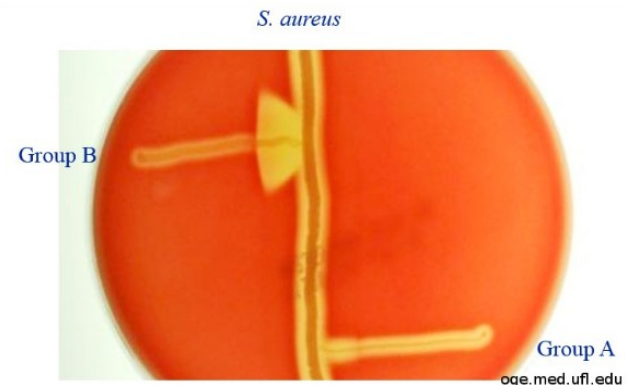


# Úkol č. 5 – Odlišení streptokoků s hemolýzou (1)

- ▶ **5a: PYR test** – biochemický test s diagnostickým proužkem: kolonie se umístí na reakční plošku proužku, po 5 – 10 minutách se přikápně činidlo → **pozitivní = červené zbarvení**
- ▶ **5b: CAMP test** – test založený na principu synergického působení dvou hemolyzinů (hemolyzu *S. agalactiae* a  $\beta$ -hemolyzinu *S. aureus*) → **pozitivní: hemolýza ve tvaru „motýlích křídel“**



en.wikidoc.org





# Úkol č. 5 – Odlišení streptokoků s hemolýzou (2)

## ► 5c: aglutinační test: lahvičky se

směsí latexových částic s navázanými protilátkami. Určete z obrázku, se kterým testovaným sérem kmen aglutinuje.



# Úkol č. 6 – Testy citlivosti

---

- ▶ **Odečtěte difúzní diskový** – srovnejte naměřené zóny se zónami referenčními.



# Úkol č. 7 – Dg. pozdních streptokokových infekcí – ASLO (1)

---

- ▶ Po každé streptokokové infekci vznikají protilátky, včetně protilátek proti streptolysinu O (streptokokový toxin)
- ▶ V případě, že množství těchto protilátek po infekci stoupá, zkříženě reagují s některými strukturami organismu → pozdní následky streptokokových infekcí
- ▶ → Revmatická horečka, akutní glomerulonefritida
- ▶ **ASLO** = zjištění míry protilátkové odpovědi po prodělané streptokokové infekci (neprokazujeme tedy infekci – ta už proběhla – ale zda nedochází k vývoji autoimunitní reakce)



# Úkol č. 7 – Dg. pozdních streptokokových infekcí – ASLO (2)

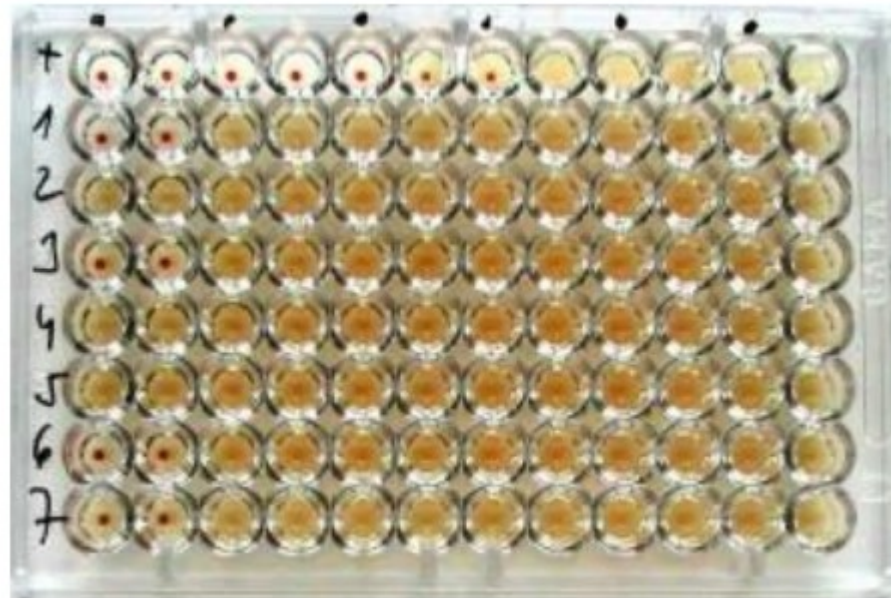
- ▶ ASLO princip: neutralizace hemolýzy
- ▶ Streptolysin O za běžných okolností (nepřítomnost protilátek) hemolyzuje červené krvinky → negativní výsledek = hemolýza
- ▶ V přítomnosti protilátky antistreptolysinu O dochází k zábraně hemolýzy a krvinky mohou sedimentovat → pozitivní výsledek = zábrana hemolýzy

Jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hodnota m.j.	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911
Pozdní následky	nehrozí				hra- niční	hrozí						

# Úkol č. 7 – Dg. pozdních streptokokových infekcí – ASLO (3)

---

- ▶ Odečet destičky se provádí naležato
- ▶ První řádek je pozitivní kontrola, další řádky jsou jednotliví pacienti
- ▶ Hodnoty ředění jsou uvedeny v protokolu



# Úkol č. 8 – Vzájemné rozlišení enterokoků

---

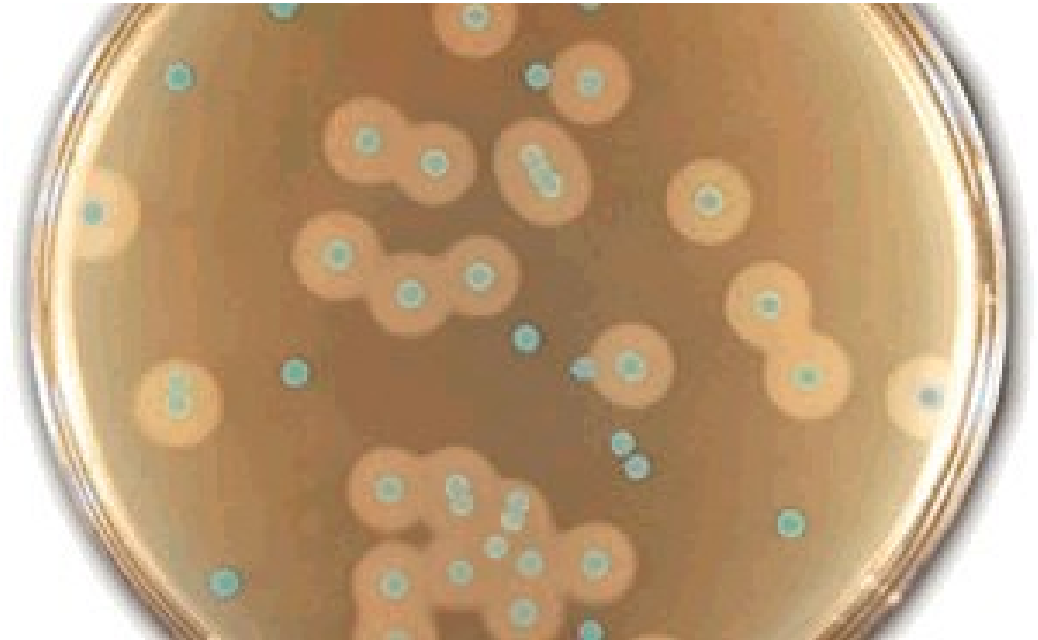
- ▶ **8a) Arabinózový test** – kolonie se smísily s arabinózou → inkubace. *E. faecalis* neštěpí → půda je **zelená**, *E. faecium* štěpí → půda **žlutne**.
- ▶ **8b) ENCOCCUStest** – 8 reakcí. Neurčujte index typičnosti a % pravděpodobnosti (nemáte jak).



# Úkol č. 9 – Diagnostika listerií

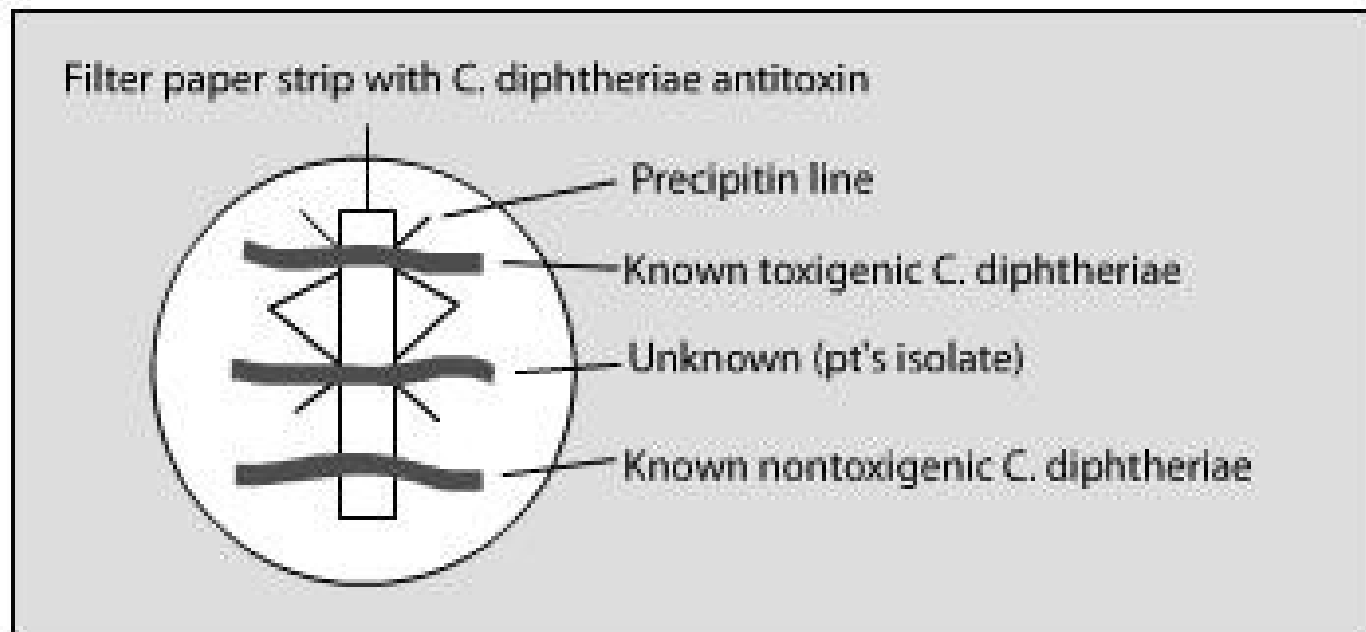
---

- ▶ **9a) Růst při 4 C** – jediná *Listeria* dokáže růst při chladničkových teplotách (z jiných bakterií např. *Yersinia*, některé druhy pseudomonád apod.).
- ▶ **9b) Růst listerie na chromogenní půdě** – ALOA půda pro *Listeria monocytogenes* (slide 19).



# Elek test

ELEK test:





# Po tomto cvičení byste měli znát:

---

- ▶ Klinický význam streptokoků, jejich diagnostiku, léčbu.
- ▶ Co je PYR test, CAMP test, ASLO.
- ▶ Klinický význam a diagnostiku enterokoků – jak je odlišit od stafylokoků, streptokoků. Onemocnění, léčba. Význam zkratky VRE.
- ▶ Klinický význam, diagnostiku a léčbu infekcí způsobených G+ tyčinkami.
- ▶ Princip a význam Elekova testu.

