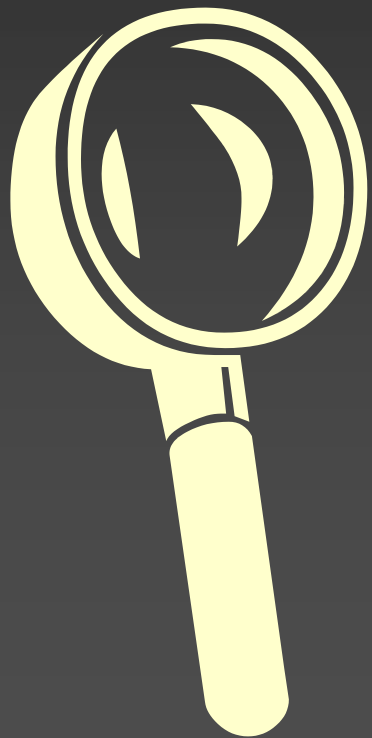


Než doopravdy začneme:

- Zapalte si kahany. Každý půlstůl si vezme jedno podložní sklíčko a kápne na něj MALOU kapku fyziologického roztoku. V ní vyžíhanou kličkou rozmíchejte jeden z kmenů. Půlstůl nejdále od tabule rozmíchá K, druhá polovina téhož stolu L, dále M a N, P a Q, R a S (kmen S bude zpracovávat půlstůl nejbliže k tabuli). Pořádně to rozmíchejte v kapce a roztáhněte do plochy. Kahan zhasněte. Během výkladu nám to výhodně uschne.
- Udělejte POUZE TOTO, nepokračujte v barvení – to budeme dělat až po výkladu!

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl druhý: Pachatelem je
streptokok

Dříve než začneme, malý testík...

- Které jsou klinicky významné G+ koky?

Stafylokoky, streptokoky, enterokoky

- Jak odlišíme stafylokoky od jiných G+ koků?

Pozitivní katalázou a růstem na 10 % NaCl

- Které testy spolehlivě odliší *S. aureus*?

Koaguláza, clumping faktor, hyaluronidáza.

- Co nám může pomoci orientačně?

Hemolýza, barva kolonií, velikost shluků.

Příběh první



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



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

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

Kdo je vinen?

- Vinen je *Streptococcus pyogenes*

strepto = v řetízcích, *pyo-genes* = hniso-tvorný

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

Příběh druhý

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



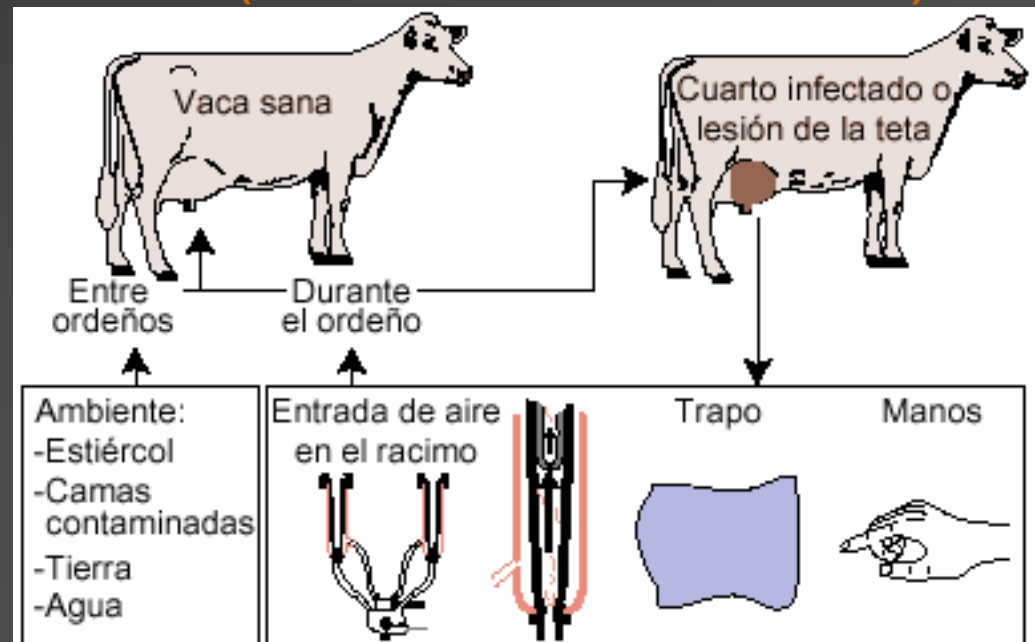
- Bilaterální granulomy na rtg obrazu...

Kdo za to tentokrát může?

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

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

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



Příběh třetí



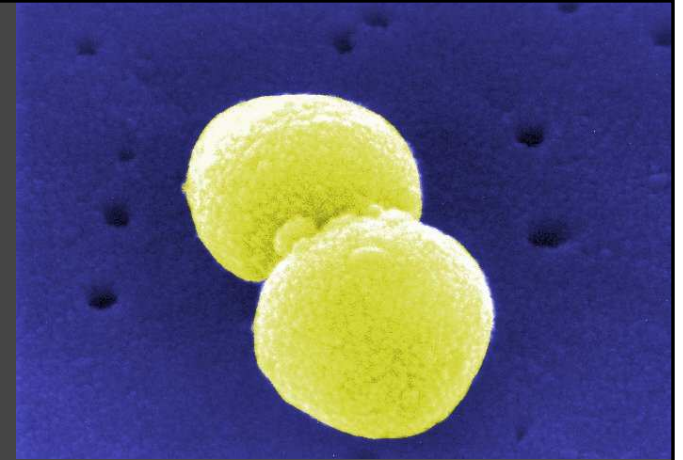
- **Klučíka Jindru** škrábe v krku a nelepší se to. Že by angína? Jenže angína je zánět mandlí, a jemu mandle „vyndali“, i ty „nosní“ (adenektomie) a dokonce i ty krční (tonsilektomie).
- Rodiče s Jindrou zašli k doktorce, ať mu napíše antibiotika. Doktorka ale rozhodla – **nejdřív výtěr z krku, a pak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



Kdo může za Jindrovu potíže?

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

Příběh čtvrtý



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

Zločincem je v tomto případě

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

Takhle tento zločinec vypadá

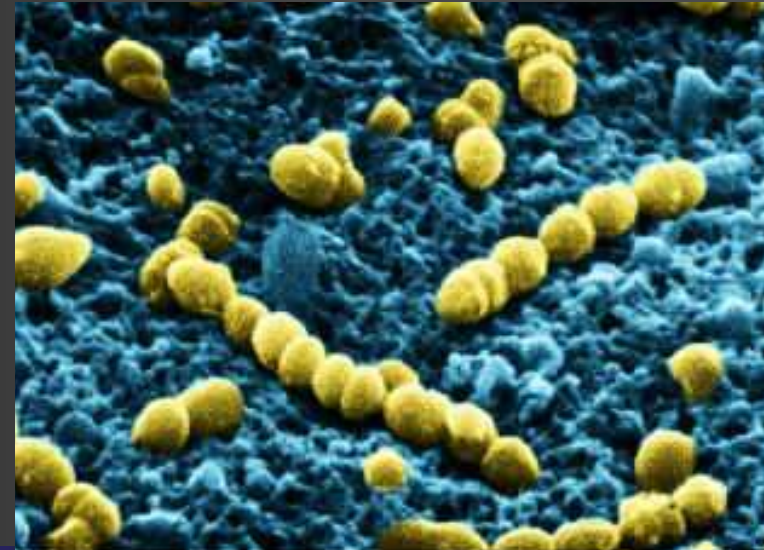
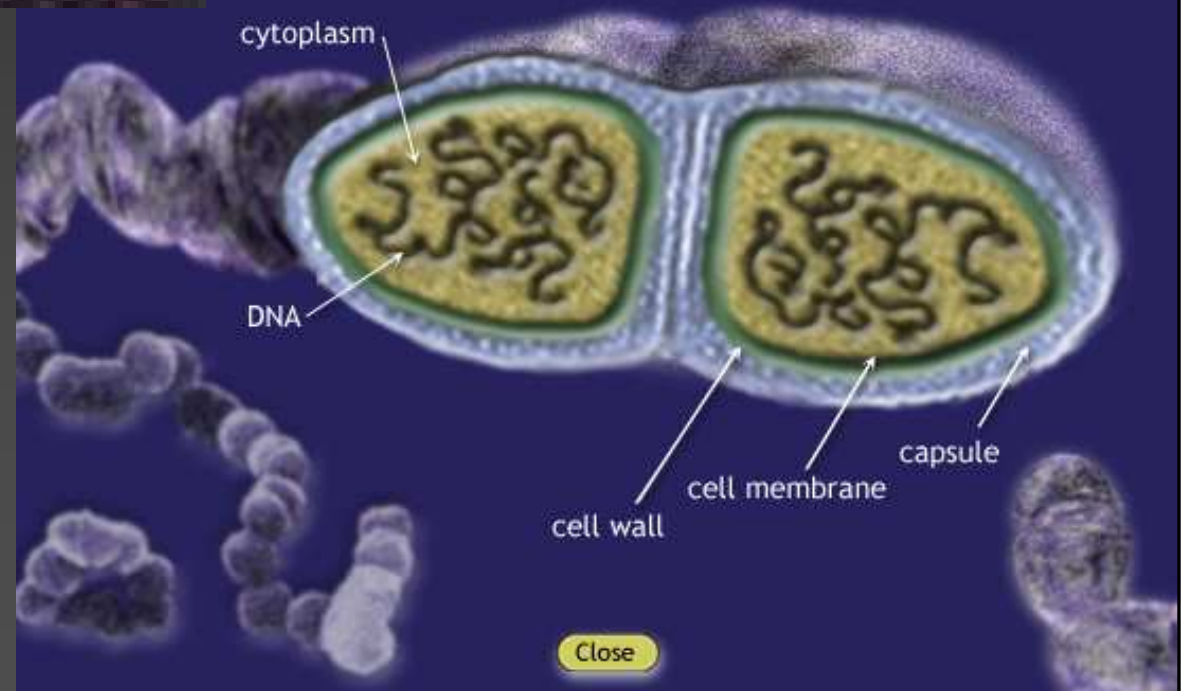
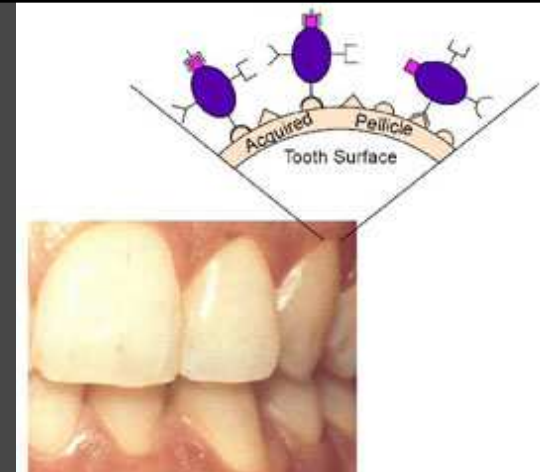


Figure 4. Cross-section of *Streptococcus pneumoniae*



Příběh pátý

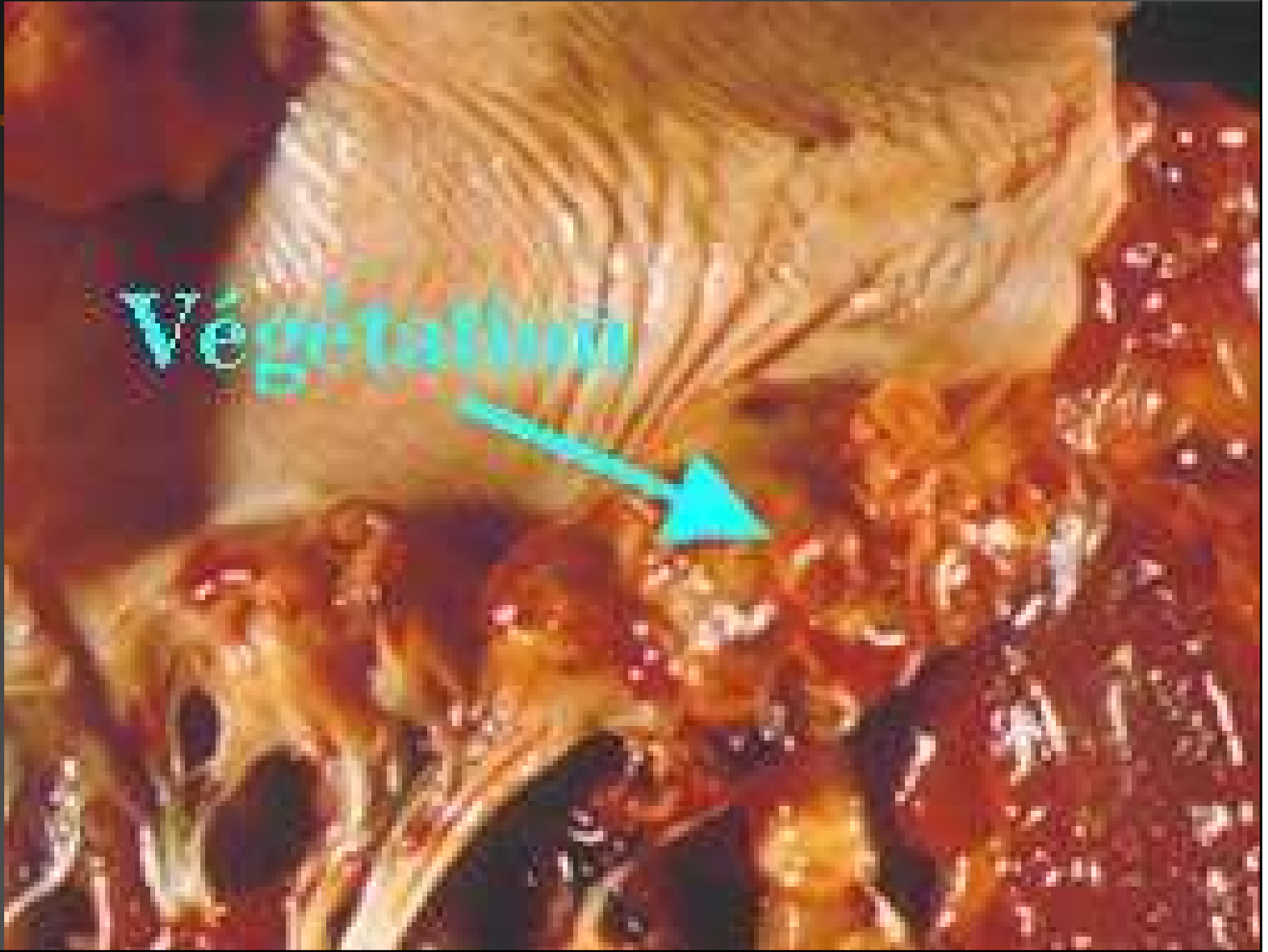


- **Pan Srdínko** má už dlouho dobu potíže se srdcem, které si dokonce vyžádali operaci, při které mu byla do srdce voperována **umělá srdeční chlopeň**.
- Před měsícem měl **ošklivý zubní kaz**, a dost dlouho trvalo, než našel čas zajít k zubaři.
- Nyní se mu zhoršily srdeční potíže natolik, že musel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

Kdo je tentokrát pachatelem?

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

Vegetace na chlopni



Udělejme si v nich pořádek

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

*u *S. agalactiae* jen částečná hemolýza

Jak vypátrat viníka?



- I dnes si zopakujeme kriminalistické **metody**, které jsme se naučili na jaře:
- **Přímé metody** jsou mikroskopie, kultivace, biochemické identifikační metody, průkaz antigenu, průkaz DNA, pokus na zvířeti apod.
- Přímé metody aplikujeme na **vzorek** (přímý průkaz ve vzorku) nebo na **kmen** (identifikace izolovaného kmene)
- **Nepřímé metody** jsou ty, kterými prokazujeme protilátky

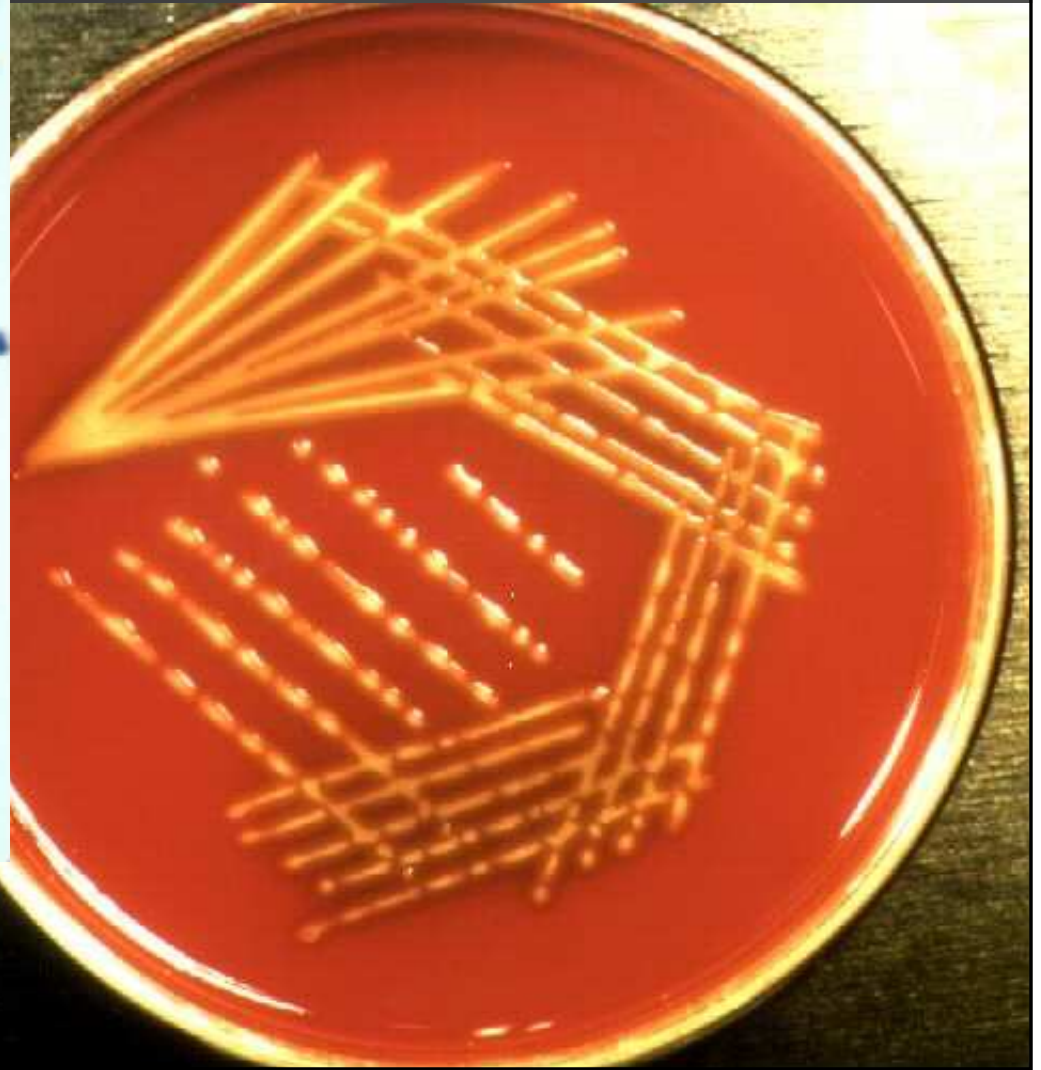
Popis pachatelů (diagnostika) – 1

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

Popis pachatelů (diagnostika) – 2

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

Fotografie z databáze zločinců



Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika 1)

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

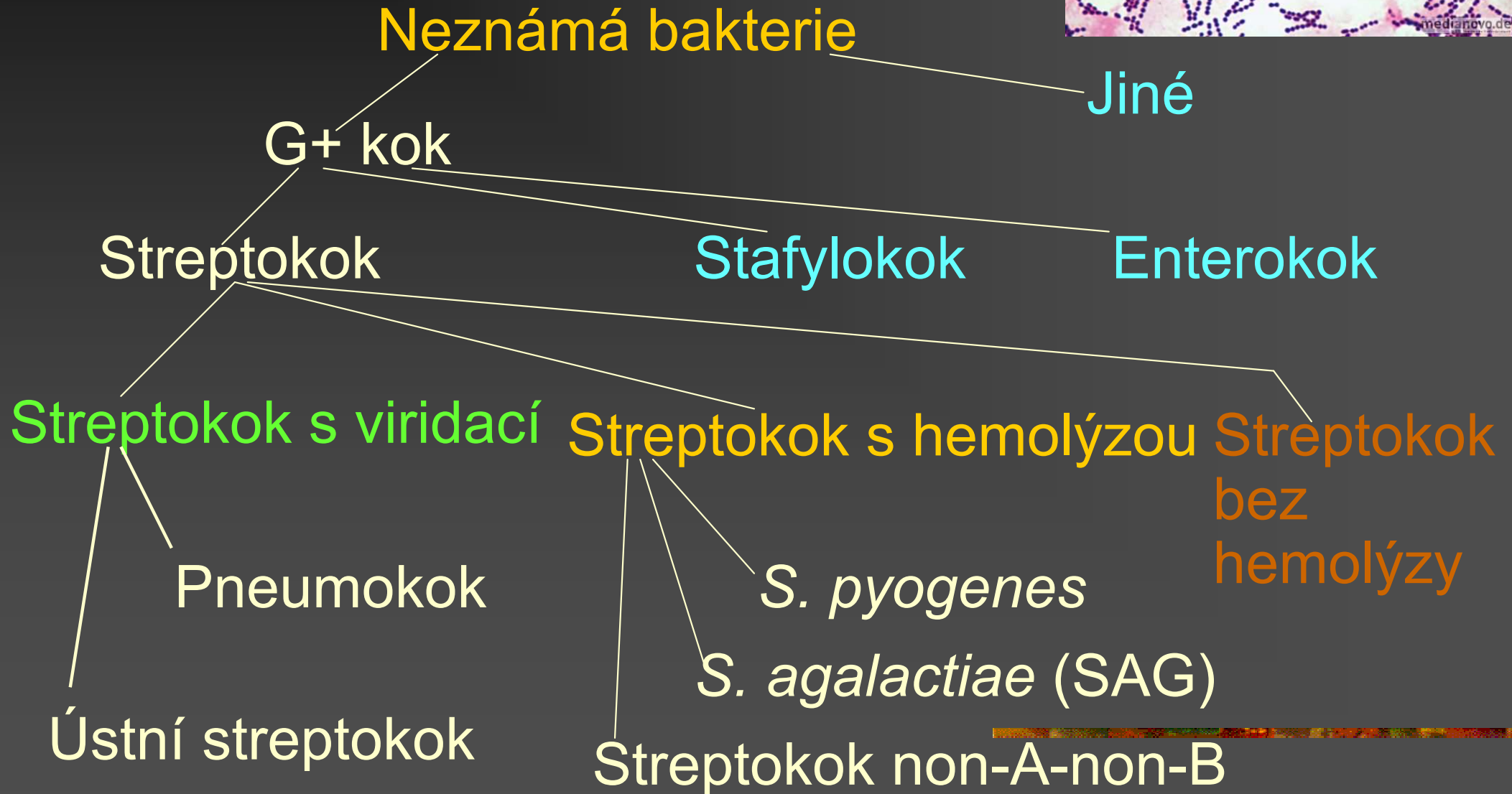


Rozlišení podezřelých streptokoků (diferenciální diagnostika 2)

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



Schematicky:



Úkol 1: Defilé podezřelých (barvení kultur podle Grama)

- Obarvěte podle Grama osm podezřelých kmenů (pro zopakování: natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem, poté barvit: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní obj.)
- Jednoho podezřelého vyloučíte snadno: bude to **G-** tyčinka. Další tři podezřelí budou **G+** koky a spolehlivě je tedy mikroskopií nedokážete rozlišit... Musíte postupovat dál

Úkoly 2 a) a 2 b): dopadení streptokoka



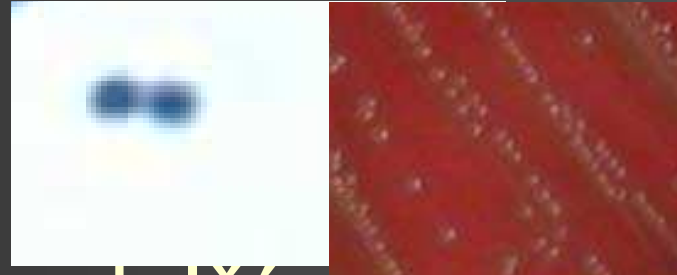
- V úkolu 2a odhalíme stafylokoka **katalázovým testem** (kolonie vmícháme do kapky peroxidu vodíku). Pokud šumí, je to stafylokok
- V úkolu 2b odhalíme enterokoka tím, že roste na **Slanetz-Bartleyho půdě**. Pozor, v protokolu se píše o půdě **žluč eskulinové**, kterou jsme ke stejnému účelu používali v době tvorby protokolů. Obě půdy jsou prakticky rovnocenné.

Úkol 3: Shromáždění otisků prstů – popis kolonií streptokoků na KA

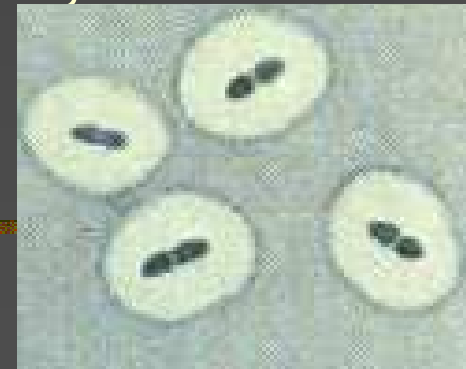
- Pečlivě si prohlédněte a popiště zbylé kmeny streptokoků. Prohlédněte si i ostatní kmeny, všimněte si, jak moc se jejich kolonie liší od streptokoků. Popisovat je však nemusíte.
- Popište všechny **vlastnosti kolonií** a zvláště si všimněte těch vlastností, které **odlišují streptokoky od ostatních gram pozitivních koků a rozlišují je navzájem** (absence pigmentu, hemolytické vlastnosti)

Pneumokok: jak pojmut podezření, aneb Než přejdeme k úkolu 4

- Pneumokoka **odlišíte** optochinovým testem – viz další obrazovka.



- **Podezření** však můžete pojmut, když:
 - mikroskopicky vidíte **lancetovité diplokoky**
 - kultivačně jsou kolonie **ploché, penízkovité až miskovité**, někdy s centrálním vyvýšením
 - někdy naopak jsou kolonie výrazné, **hlenovité** to jsou kmeny s výraznou tvorbou pouzdra (zpravidla velmi virulentní)



Úkol 4a): Optochinový test

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



Úkol 4b): Druhové určení ústního streptotkoka

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

STREPTOtest 16 – jak odečíst

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

Dnes už to nebudeme dělat společně jako minule, určitě už to zvládnete sami 😊

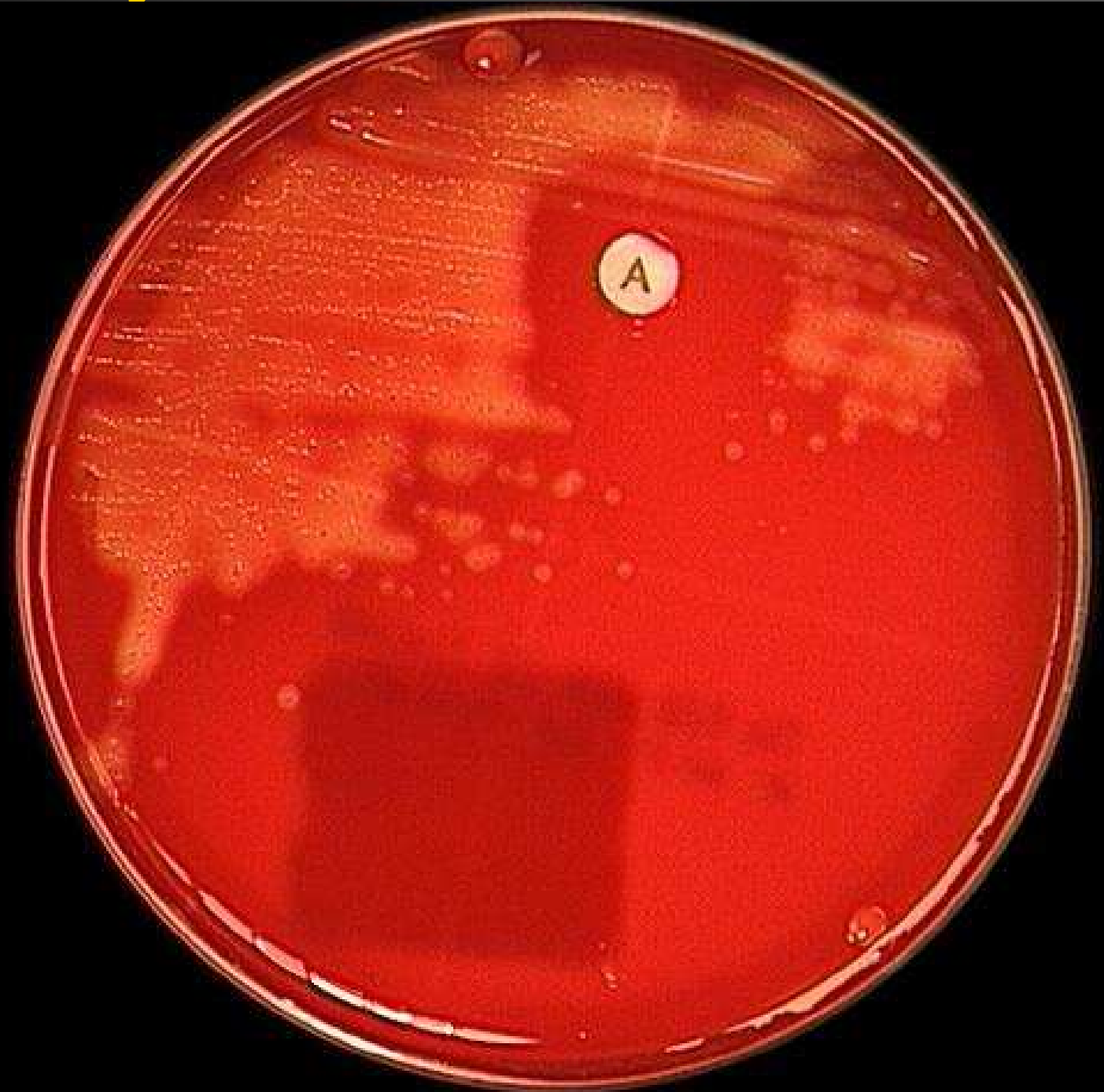
A pak už se vrhneme na streptokoky s hemolýzou...

Obzvláště obávaný pachatel: pyogenní streptokok. Jak na něj?

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



Bacitracinový test



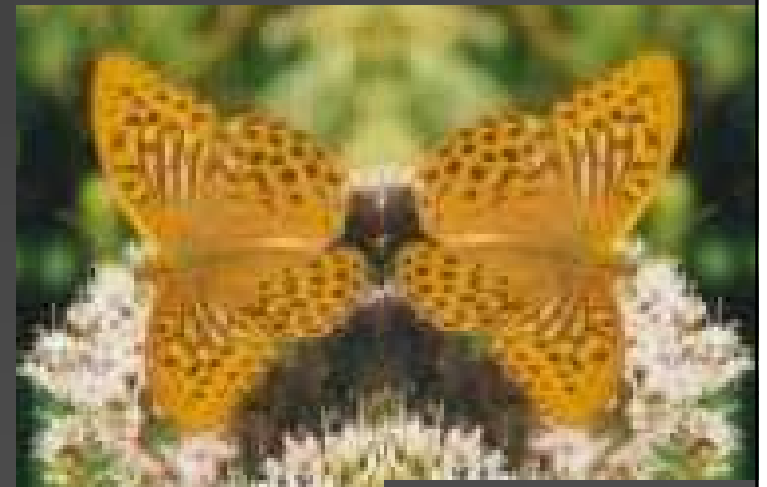
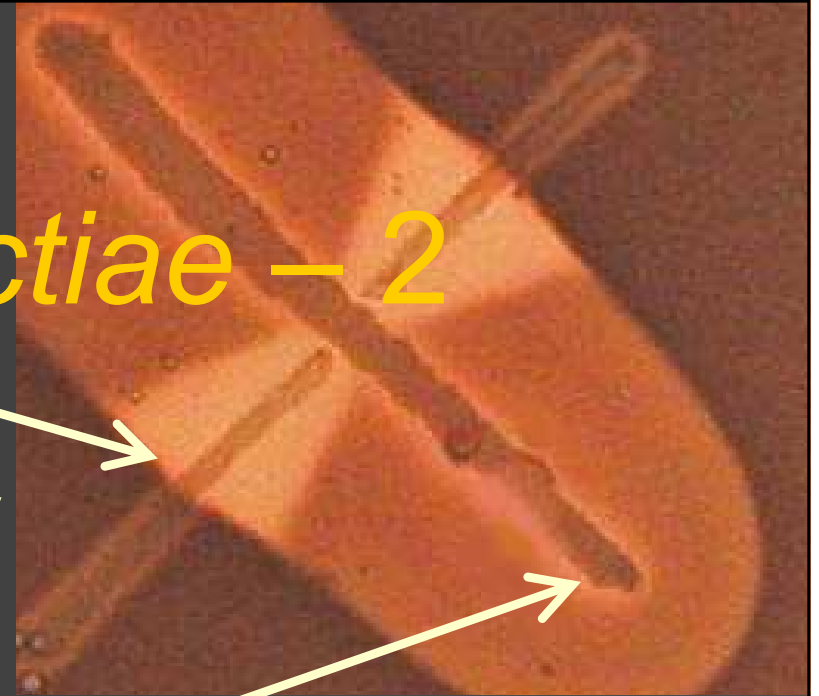
A přichází druhý:

Streptococcus agalactiae – 1

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

Streptococcus agalactiae – 2

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



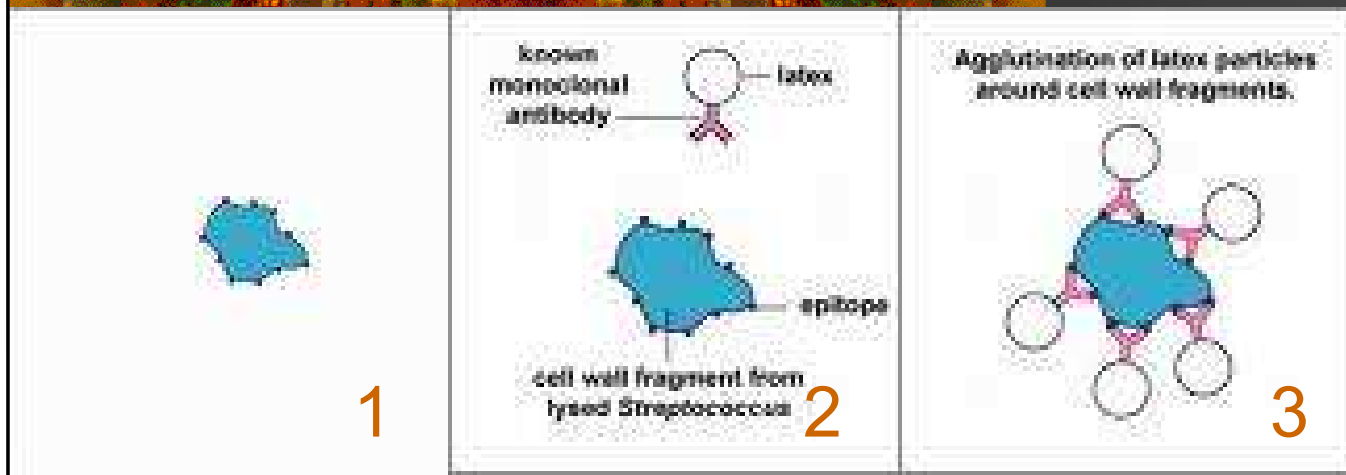
Hemolytiční pachatelé – shrnutí

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

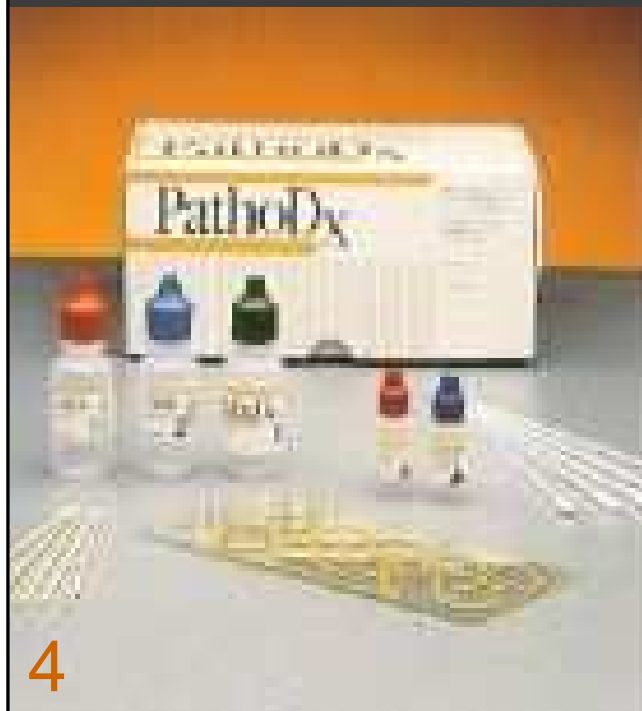
Bacitracinový a PYR test	CAMP test	Streptokok
pozitivní	negativní	<i>S. pyogenes</i>
negativní	pozitivní	<i>S. agalactiae</i>
negativní	negativní	non-A-non-B streptokok
pozitivní	pozitivní	ptákovina, špatný test, případně směs dvou kmenů

Latexová aglutinace – demonstrace

Místo videa si prohlédněte obrázky



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



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

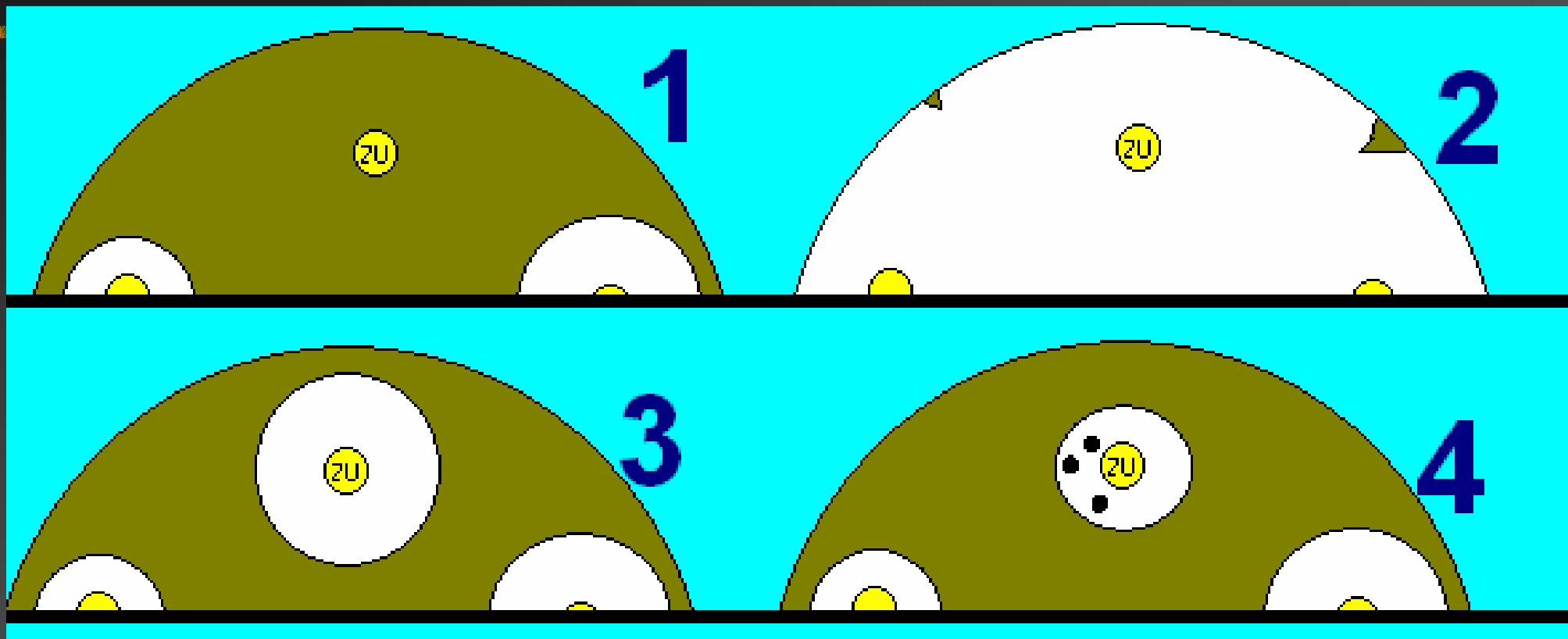


Léčba: spravedlivý trest zločinci

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

Jak odečítat testy citlivosti

(Zařazeno po zkušenostech z minulého týdne)



1 – žádná zóna, lze bez měření rovnou zapsat „R“

2 – zóna je tak veliká, že splývá s ostatními zónami; lze bez měření konstatovat „C“

3 – zóna, kterou je třeba změřit a porovnat velikost

4 – kontaminace uvnitř zóny: tváříme se, jakoby neexistovala, pro

Úkol 6: účinnost uloženého trestu

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

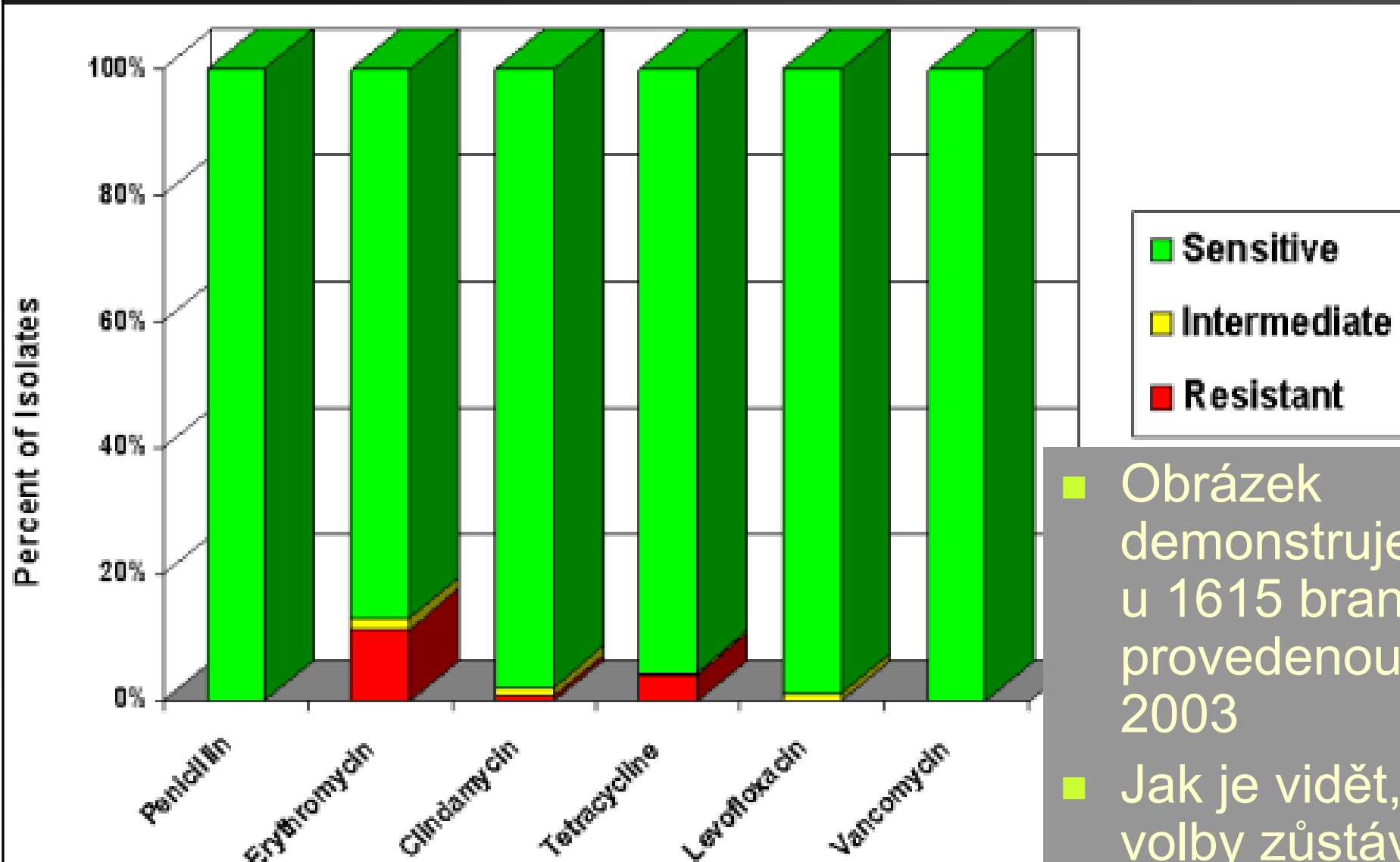
Ovšem v diagnostice se to nedá využít, protože některé streptokoky vyrůst mohou!

Test citlivosti na streptokoky

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

Klindamycin se běžně testuje, vy ho však ve své sestavě nemáte!

Citlivost streptokoků na antibiotika



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

Skandální zjištění !!!

Streptococcus pyogenes je ještě horší, než jste možná čekali

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

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

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

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

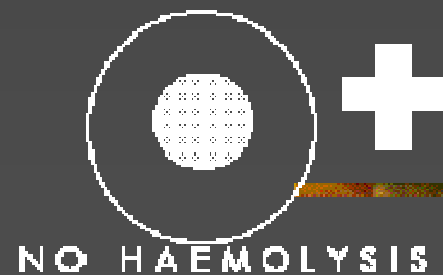
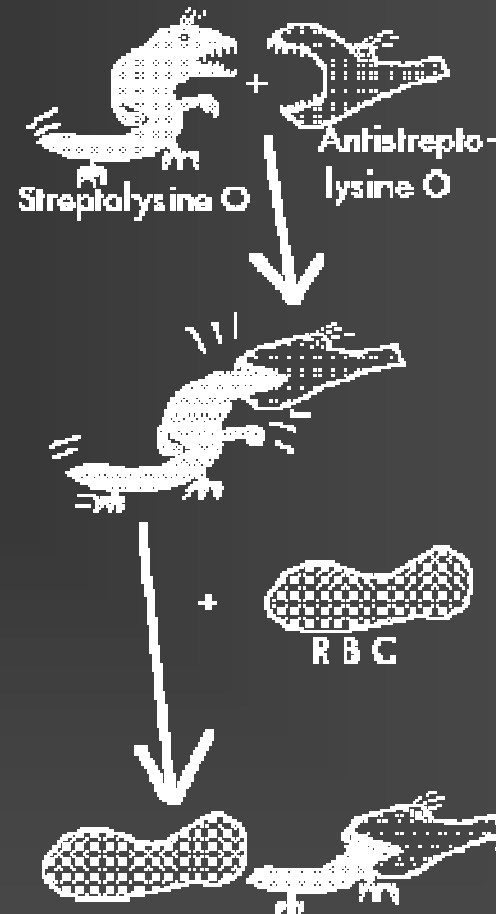
ASLO: princip (opakování)

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

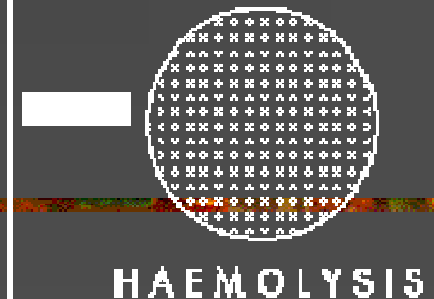
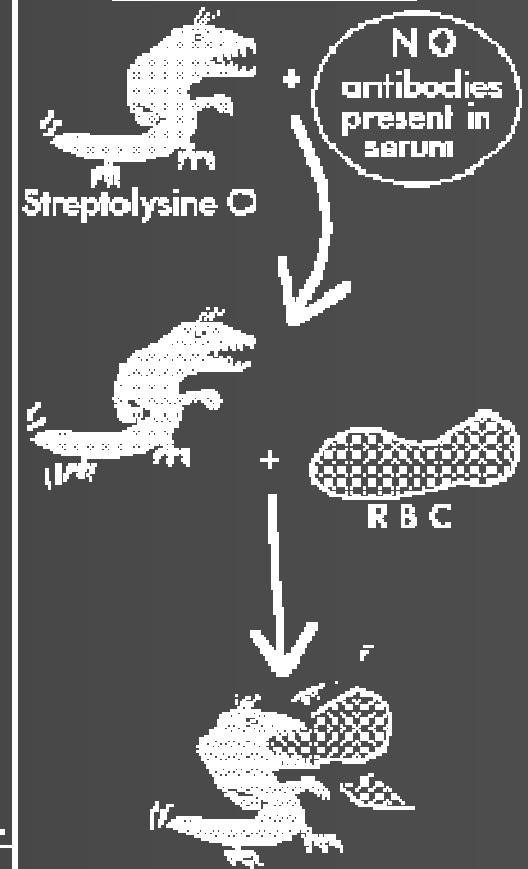
Detection of ASO

Anti-streptolysine O

Positive reaction:



Negative reaction:



Úkol 7: Odečtěte panel ASLO

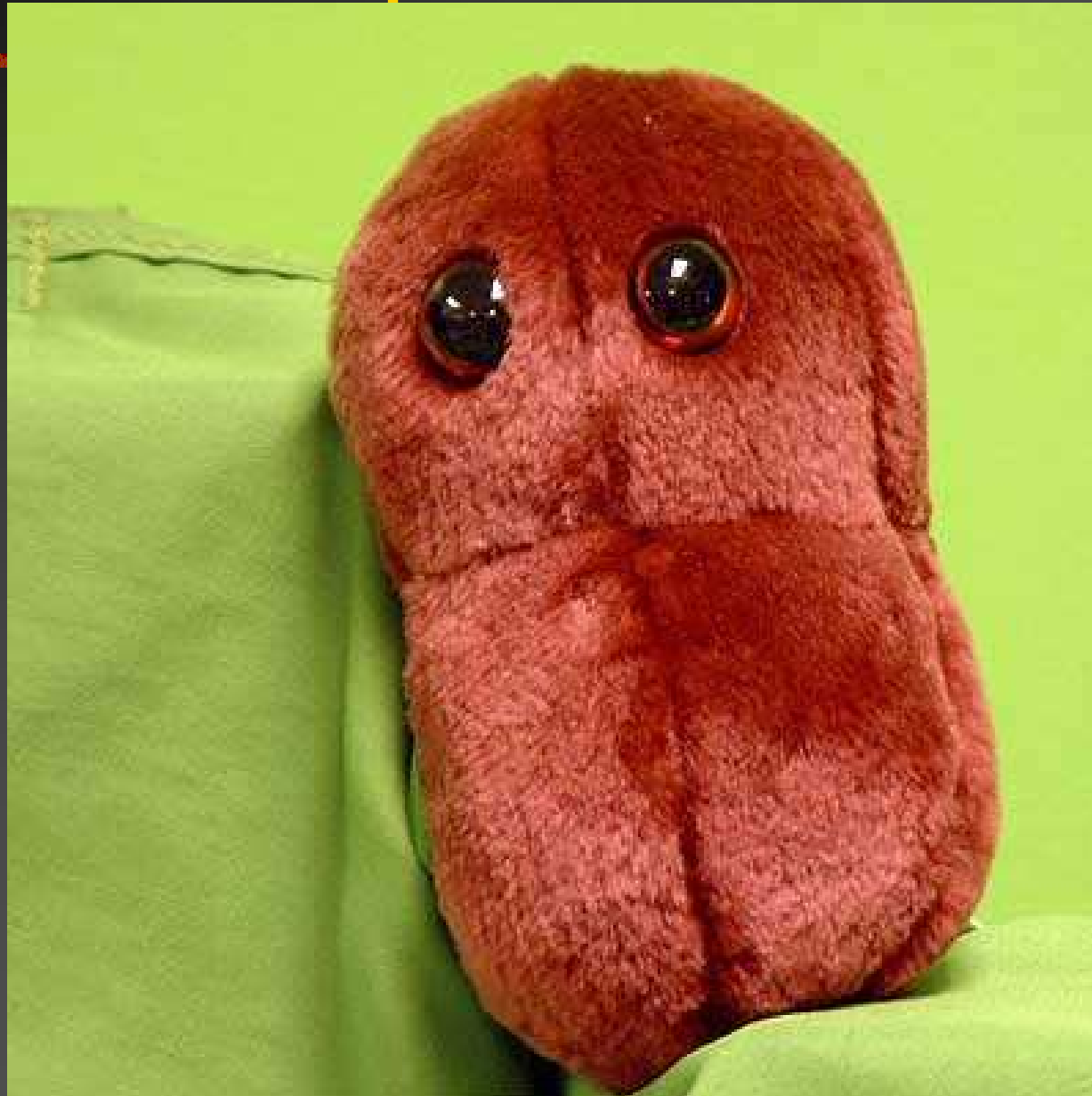
- Pozor! Každý pacient jen jeden řádek, hodnoty ředění jsou uvedeny na lístečcích, které máte na stole a zde:

Hodnocení výsledků ASLO

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

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

Nashledanou při dalším dílu!



Plyšový
streptokok