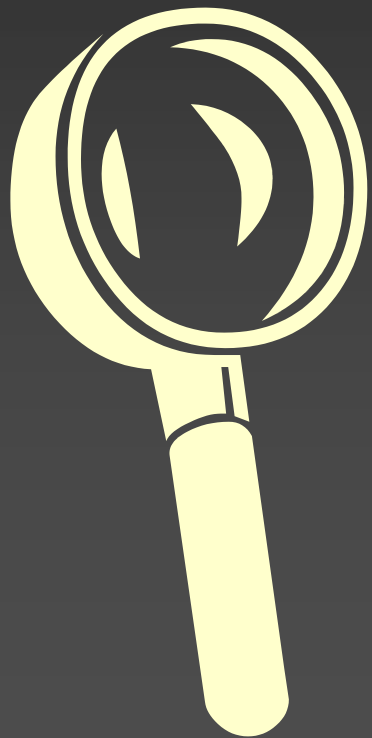


Než doopravdy začneme:

- 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 třetí:

Další gram pozitivní
pachatelé

Dříve než začneme, malý testík...

- Které jsou klinicky významné G+ koky?

Stafylokoky, streptokoky, enterokoky

- Jak odlišíme od ostatních stafylokoky?

Pozitivní katalázou a růstem na 10 % NaCl

- Jak rozlišíme streptokoky od enterokoků?

Streptokoky nerostou na SB ani na ŽE půdě.

- Proč nám může pomoci i PYR test?

Jediný streptokok, který je pozitivní,

Streptococcus pyogenes, má menší kolonie než enterokoky, a výraznou hemolýzu

Pozor, testík pokračuje...

- Víme, že určitý kmen je streptokok. Co dál?

Dalším krokem je hodnocení hemolýzy na KA

- Je mezi streptokoky s viridací jasný patogen?

Ano, pneumokok – *Streptococcus pneumoniae*

- Jak ho poznáme od ústních streptokoků?

Mikroskopicky, kultivačně, a hlavně OPT testem

- Kdy a jak rozlišujeme ústní streptokoky?

Tam, kde je považujeme za patogeny, např. u hemokultury. Provádíme to biochemicky

A testík ještě pokračuje...

- Které streptokoky s hemolýzou jsou výrazné?

Vyniká mezi nimi *S. pyogenes* a *S. agalactiae*

- Jak poznáme prvního z nich?

Pozitivním PYR testem a bacitracin. testem

- A jak odlišíme toho druhého?

CAMP testem – testem hemolyt. synergismu

- Dá se tímto testem hledat i zlatý stafylokok?

Nedá – ne každý produkuje příslušný hemolyzin

CAMP test – pro zopakování

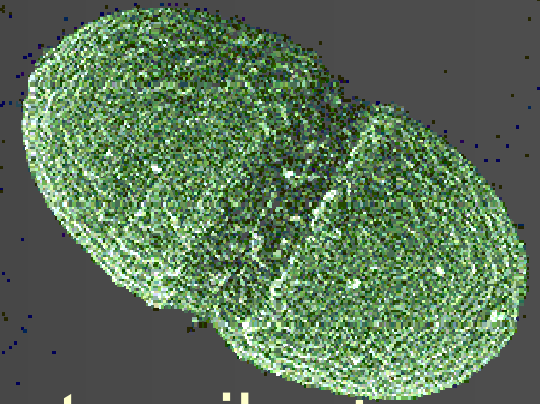


Příběh první

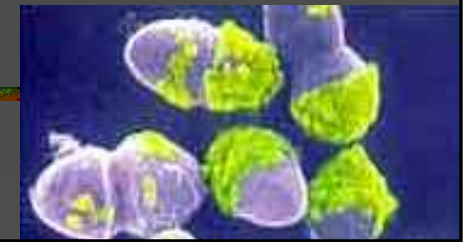
- **Lucinka** chodí do školky. Před dvěma týdny si maminka všimla, že **chodí nějak často na záchod**, a také se jí **svěřila, že když se chce vyčurat, tak jí to bolí**. Pan doktor na středisku jí **předepsal Zinnat, ale potíže se nezlepšily**. Při další návštěvě tedy nechal Lucinku vyčurat do „šampusky“ a **moč poslal na mikrobiologii**. Přišlo mu ale, že **výsledek nelze hodnotit, neboť moč je kontaminovaná**. Nakonec se přece jen podařilo moč odebrat asepticky a podle výsledku změnit terapii.



Pátráme po pachateli



- Vinen je *Enterococcus faecalis*
- Jak napovídá rodové i druhové jméno, je to mikrob normálně se vyskytující ve střevě. Je ale také jedním z nejběžnějších původců močových infekcí
- Viníkem je ovšem i lékař – předepsal antibiotika bez kultivace moče; bohužel, enterokoky jsou na všechna cefalosporinová antibiotika primárně rezistentní. Navíc podcenil aseptický odběr moče.
- Možná něco zanedbala i maminka, pokud Lucinku nenaučila dobře (a odpředu dozadu) se utírat po záchodě

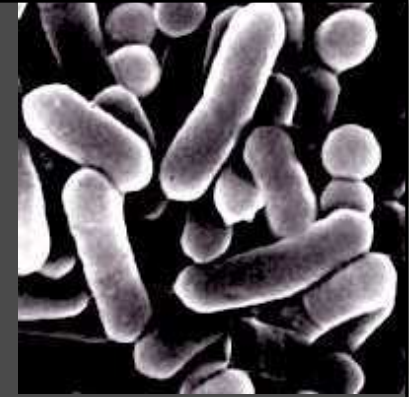


Příběh druhý

- Evropský komisař zachmuřeně hleděl na kupu stížností. Francouzští zemědělci protestují proti několika státům EU, které brání dovozu **delikatesních francouzských sýrů** na jejich území.
- Německé úřady zákaz dovozu zdůvodňují tím, že těhotná paní Hildegarda Messerschmidtová po požití sýra pozorovala **zvětšené mízní uzliny** a nakonec její dítě trpělo těžkou listeriovou infekcí.



Kdo za to tentokrát může?



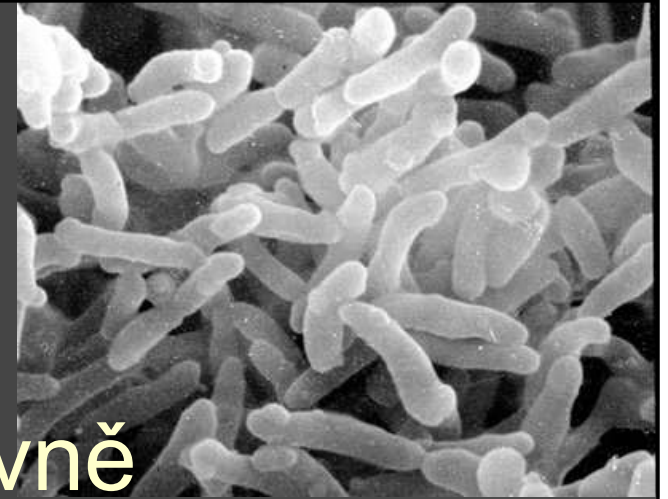
- Bakterie *Listeria monocytogenes* je grampozitivní tyčinka, která se vyznačuje schopností růst při nízkých teplotách a vysokých koncentracích NaCl, což je oboje splněno např. ve skladech sýrů
- Málokdy vyvolává viditelné infekce dospělých, snad s výjimkou uzlinového syndromu. Je však nebezpečná pro těhotné
- Někdy se stává záminkou pro omezení dovozu – je samozřejmě vždy otázkou pohledu, zda je omezení skutečně motivováno strachem o zdraví občanů, nebo snahou obejít ustanovení o volném trhu

Příběh třetí

- Pan Bércoun je diabetik, chronický pacient, nyní léčen pro **bércové vředy**. Bohužel, infekce střídá infekci. Před půlrokem byla usvědčena *Escherichia coli*, před dvěma měsíci zase *Enterococcus faecium*, blízký příbuzný enterokoka *Enterococcus faecalis*. Lékaři jsou zvědaví, co se z bércového vředu pana Bércouna vykultivuje tentokrát.



A už to vědí: viníkem je nyní



- *Corynebacterium jejkeium*, relativně nejobávanější ze skupiny tzv. nedifterických (= nezáškrťových) korynebakterií. Původně se mu říkalo „korynebakterium skupiny JK“.
- Korynebakteria jsou grampozitivní tyčinky kyjovitého tvaru (koryné = kyj), některá jsou pleomorfní (různotvará), popřípadě i nekonstantně probarvená.
- Do stejného rodu patří i původce záškrtu, dnes díky očkování u nás vzácný – *C. diphtheriae*.

Co ještě vědět o korynebakteriích

- Jsou normální součástí běžné flóry na kůži, spolu se stafylokoky a kvasinkami
- V mikroskopii se vyznačují palisádovým uspořádáním – název dle raně středověkého kúlového opevnění



Záškrť

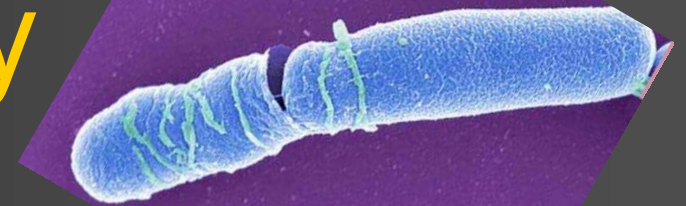


Příběh čtvrtý



- Sestřička Blaženka se zděsila: přišly výsledky stěrů z nemocničních lůžek, které před týdnem odebírali pracovníci nemocniční epidemiologie. A skoro v polovině stěrů se našly nějaké bakterie, dokonce BACILY! No ano, tady to je – *Bacillus* sp. Sestřička Blaženka, chudinka ubohá, se celou noc trápila a špatně spala. Ráno zavolala na mikrobiologii a ptala se, cože je to za bakterii...

Mlýnský kámen spadl z dobrého srdíčka sestry Blaženky

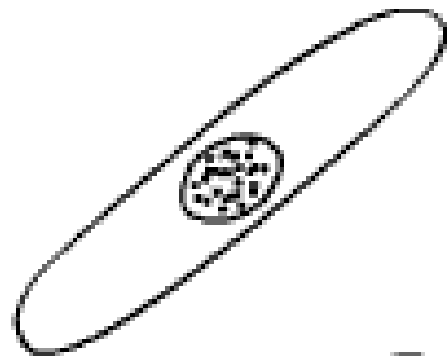
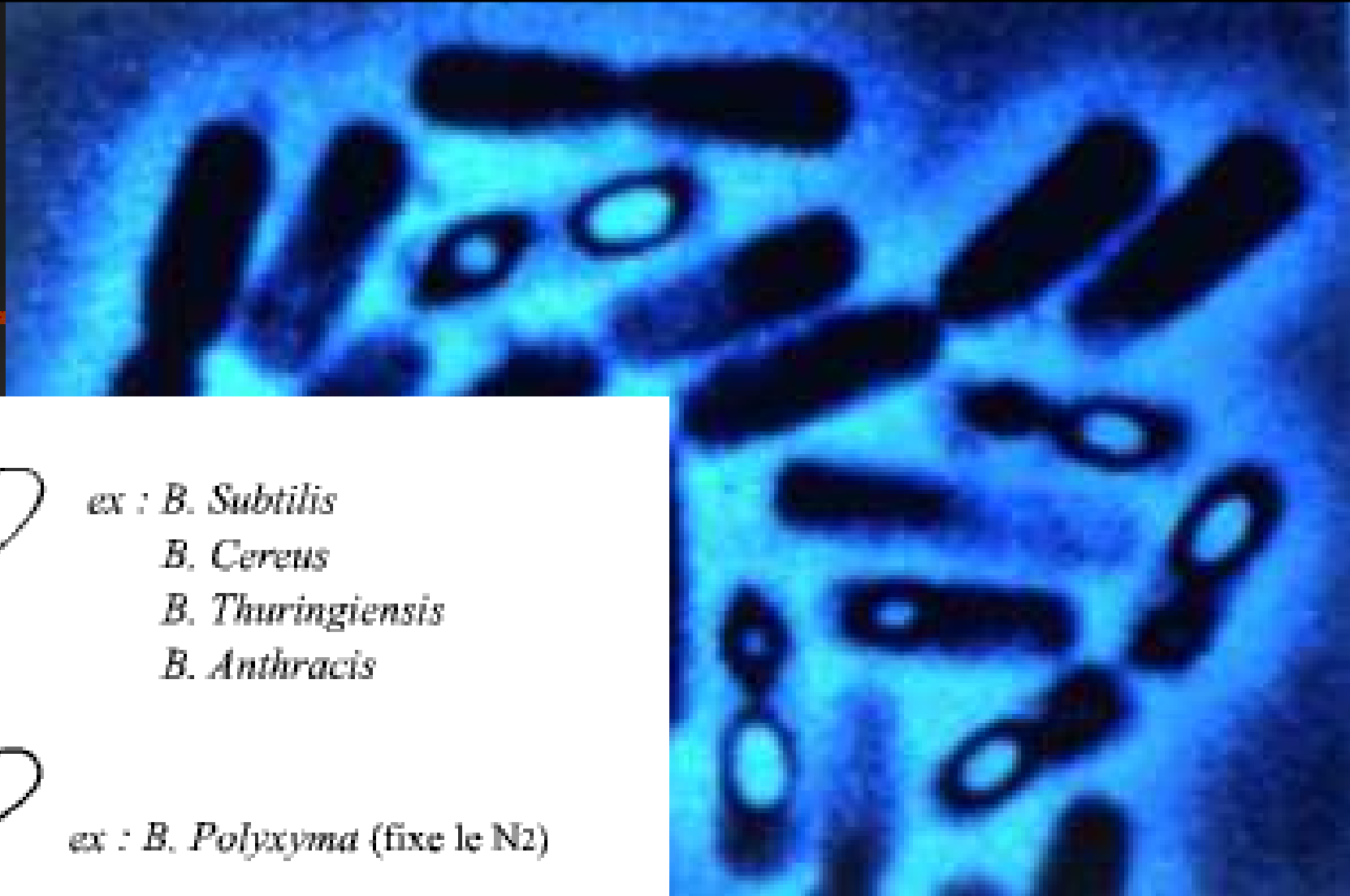


- když se dozvěděla, že většina příslušníků rodu *Bacillus* jsou neškodné mikroby, vyskytující se ve vnějším prostředí. Pokud se vyskytnou v kultivaci klinického vzorku, jde pravděpodobně o kontaminaci. Bacily tedy nejsou ve stěrech z lůžka závažným nálezem. Problém by byl jen tehdy, pokud by byly prokázány ve stěru z plochy, která má být sterilní (např. operační pole po dezinfekci)

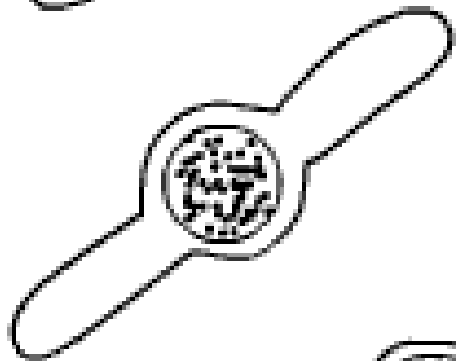
Není bacil jako Bacil! Například „Bacil“ na www.pismak.cz je známý as. Zahradníček ☺

Bacily, které stojí za zmínku

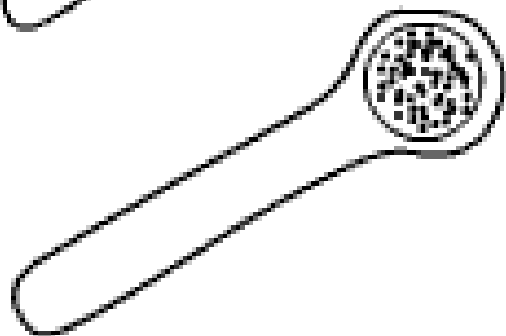
- *Bacillus anthracis* se stal velice populárním při teroristických hrozbách poslední doby. Jinak coby původce veterinárního onemocnění – uhláku – byl jednou z prvních nákaz, proti nimž byla zkoušena (již Pasteurem) vakcinace.
- *Bacillus cereus* je původcem alimentárních intoxikací z obilných produktů.
- *Bacillus stearothermophilus* a *Bacillus subtilis* se vzhledem ke své schopnosti přežívat při velmi vysokých teplotách používají jako indikátory účinnosti sterilizátorů



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



ex : *B. Polyxyma* (fixe le N₂)



ex : *B. Pasteurii* (dégrade l'Urée)

Udělejme si v pořádek v G+ bakteriích

Příběh	Tvar	V policejní kartotéce vedeni jako
P01	Lékařsky významné Koky	Stafylokoky (<i>S. aureus</i> , koag. neg. st.)
P02		Streptokoky (s viridací, hemol., bez)
1.		Enterokoky (<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>)
2.		Listerie (typicky <i>L. monocytogenes</i>)
3.	Lékařsky významné Tyčky	Korynebakteria
4.		Bacily




Listerie a korynebakteria nesporulují, bacily sporulují

Metody k prokázání viníka



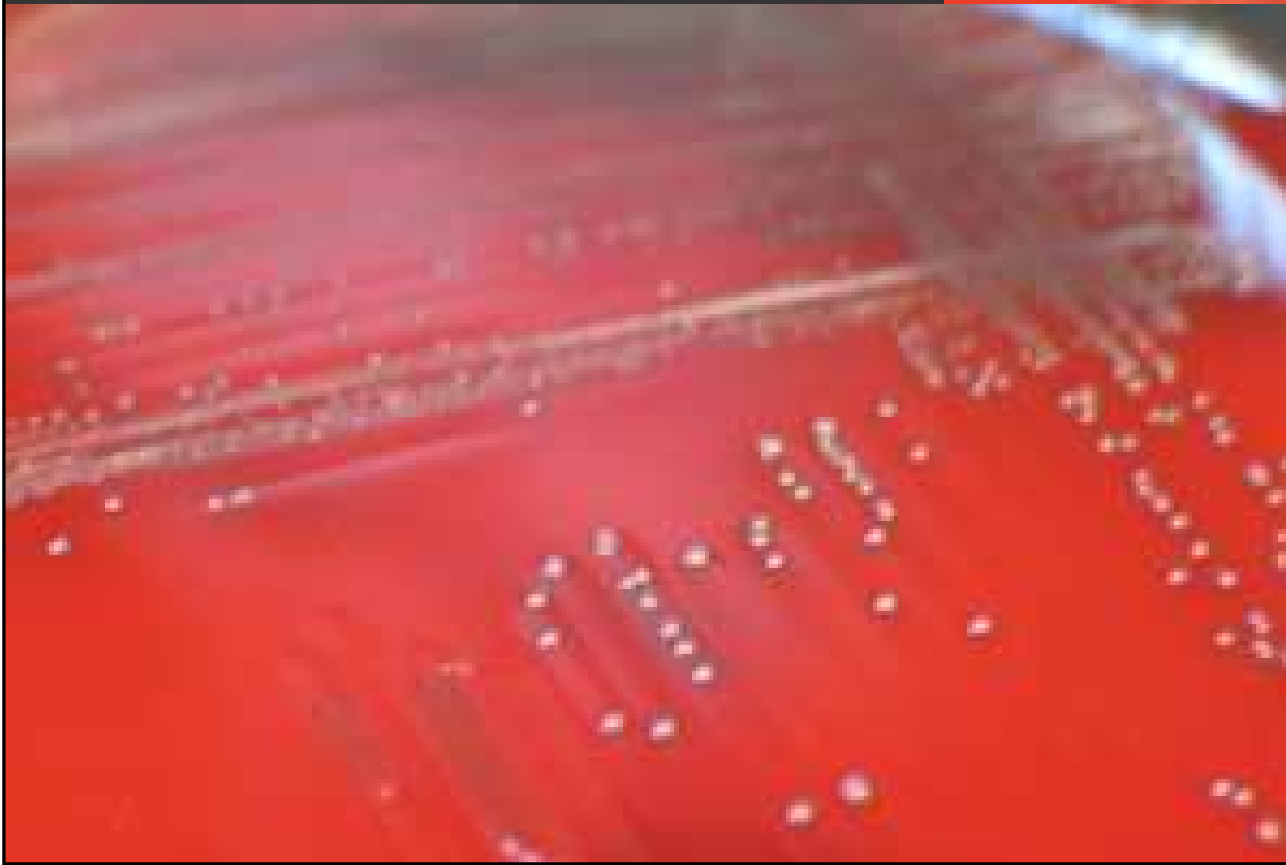
- **Přímé metody (mikrob – část – produkt):**
 - **Mikroskopie** – průkaz ve vzorku i id.
 - **Kultivace** – průkaz ve vzorku i identifikace
 - **Biochemická identifikace** – jen identifikace!
 - **Průkaz antigenu** – průkaz ve vzorku i id.
 - **Pokus na zvířeti** – zpravidla průkaz ve vzorku
 - **Průkaz nukleové kyseliny** – zpravidla jen průkaz ve vzorku *Červeně označené dnes neuplatníme*
- **Nepřímé metody (protilátky)**

Popis pachatelů (diagnostika) – 1

	Enterokok	Listerie	Koryneb.	Bacillus
Mikroskopie	<p>G+ koky v. krátkých řetězcích</p> 	<p>G+ tyčinky řetězí se jako špekáčky</p>	<p>G+ tyčinky skládající se vedle sebe (palisády)</p>	<p>G+ robustní tyčinky, sporulující (nemusí být viditelné)</p>
Kultivace	<p>šedavé, velké asi jako <i>Str. agalactiae</i>, většinou bez hemolýzy, ale i s virid. či h.</p>	<p>podobné entero- kokům, hemolýza je či není</p>	<p>velmi drobné kolonie podobné mouce</p>	<p>plst'ovité kolonie, někdy i výrazná hemolýza</p>

Enterokoky – vzhled kolonií

vpravo varianta s drobnějšími koloniemi – klonální kmen patřící mezi VRE



Popis pachatelů (diagnostika) – 2

Enterokoky



- **Biochemické testy:** kataláza negativní, možné je biochemické rozlišení, důležité štěpení arabinosy (*E. faecalis* neštěpí, půda je zelená, *E. faecium* štěpí, žlutne)
- **Antigenní analýza** se zpravidla nepoužívá. V dobách, kdy patřily mezi streptokoky, je Lancefieldová zařadila do antigenní skupiny D, spolu s některými streptokoky
- **Citlivost** lze testovat na běžném MH agaru. Existují i **půdy na skríníng VRE** (viz dále)

Popis pachatelů (diagnostika) – 2

G+ tyčinky

- **Biochemické testy:** kataláza u všech tři pozitivní, ale např. u rodu *Arcanobacterium* (blízkého korynebakteriím) je negativní! Biochemicky lze rozlišovat koryneformní tyčinky navzájem (API Coryne)
- **Růst při nízkých teplotách, vysokých koncentracích NaCl a hemolytické interakce** se používají v diagnostice listerií
- **Citlivost** lze testovat na běžném MH agaru. Existují i **půdy na skrínig VRE** (viz dále)

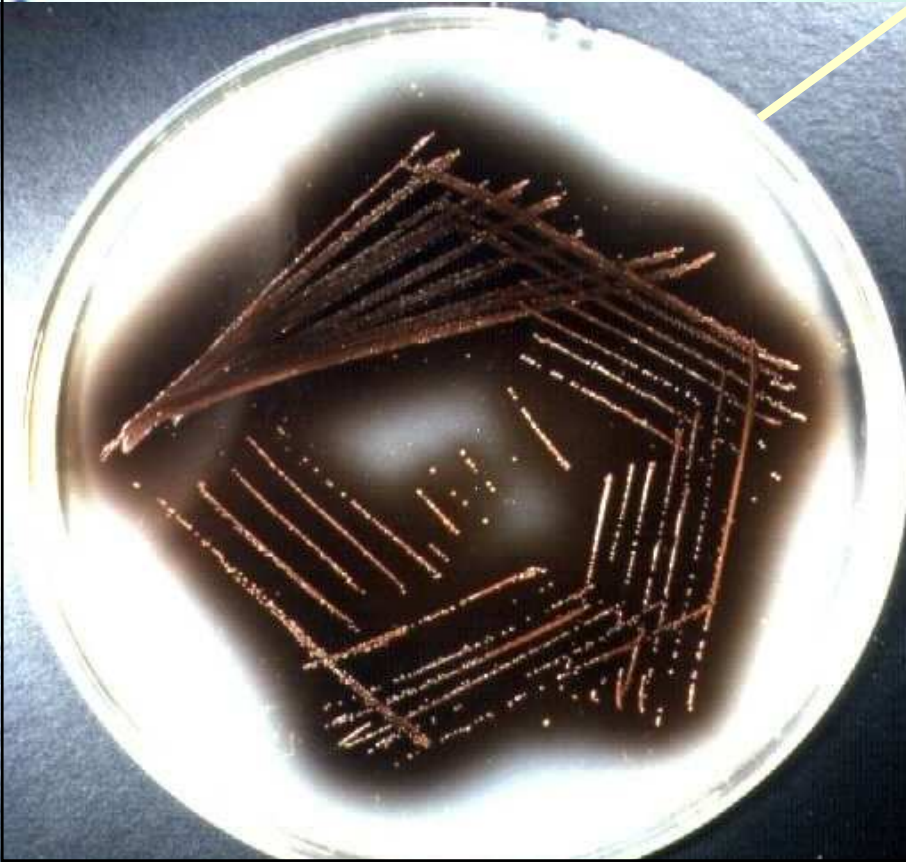
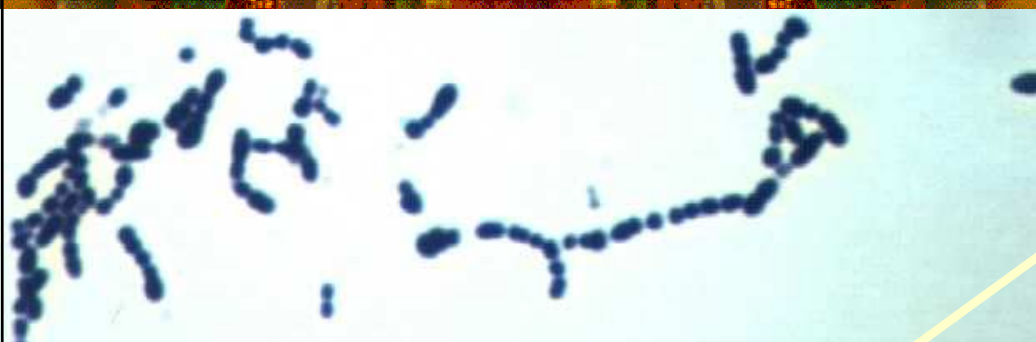
Fotografie z databáze zločinců 1

Enterokoky

Mikroskopie

Žluč-eskulin

Slanetz-Bartley

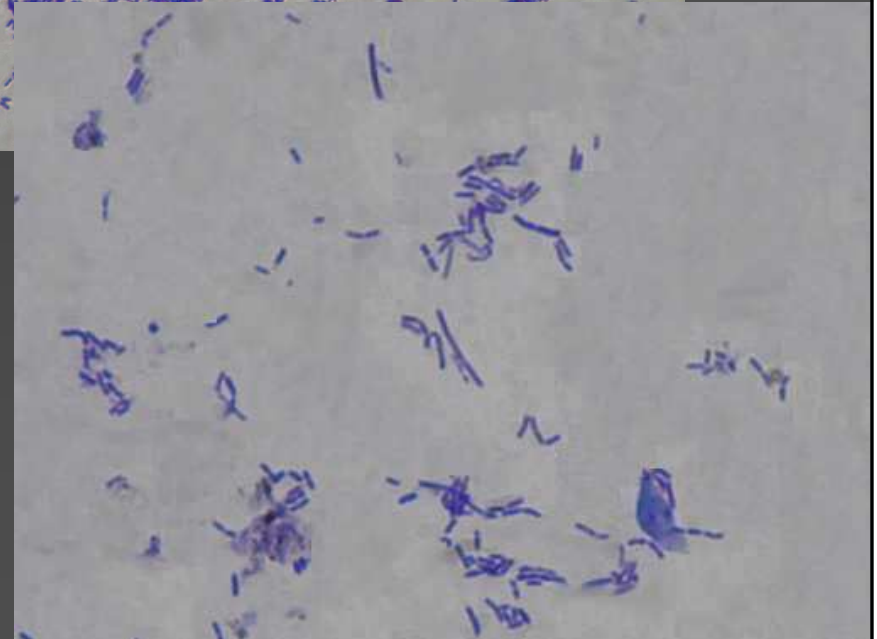
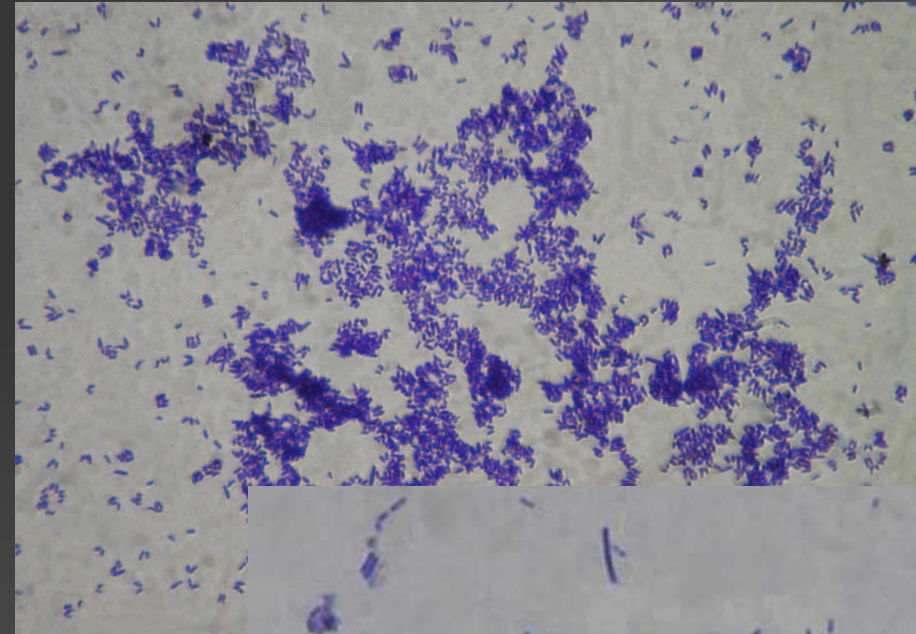


Fotografie z databáze zločinců 2

Tyčinky I

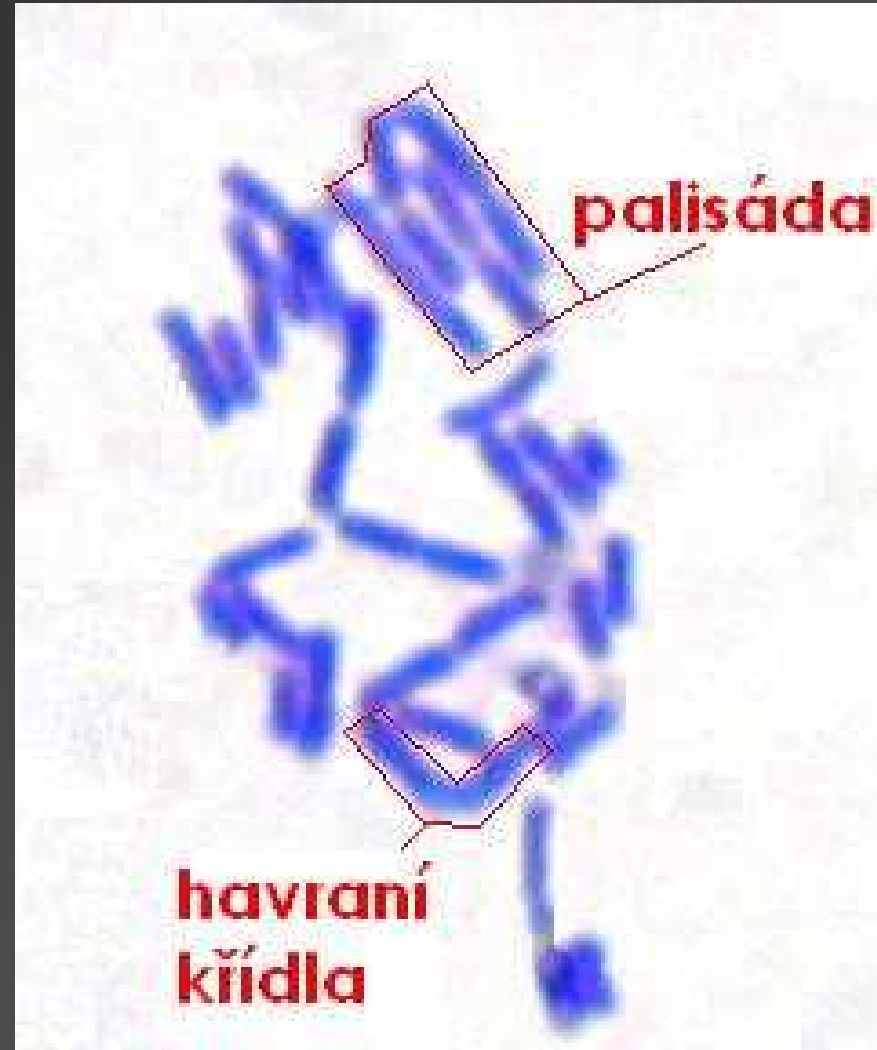
Corynebacterium Gram

Listeria – KA, gram



Fotografie z databáze zločinců 3

Tyčinky I – korynebakteria, tvary



Fotografie z databáze zločinců 4

Tyčinky III

Bacillus
cereus



Arcanobacterium
haemolyticum



Bacillus subtilis



Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika)

- Gramovo barvení rozliší grampozitivní koky, grampozitivní tyčinky a ostatní bakterie.
- **Koky** rozlišíme katalázou, růstem na NaCl (stafylokoky), růstem na Slanetz-Bartleyho či ŽE půdě, popř. PYR testem (enterokoky)
- **Tyčinky** rozliší mikroskopická morfologie, morfologie kolonií a různé další testy
- **Korynebakteria navzájem** rozliší například biochemický test API Coryne nebo v našich podmínkách STAPHYtest + STREPTOtest

Úkol 1: Defilé podezřelých (barvení kultur podle Grama)

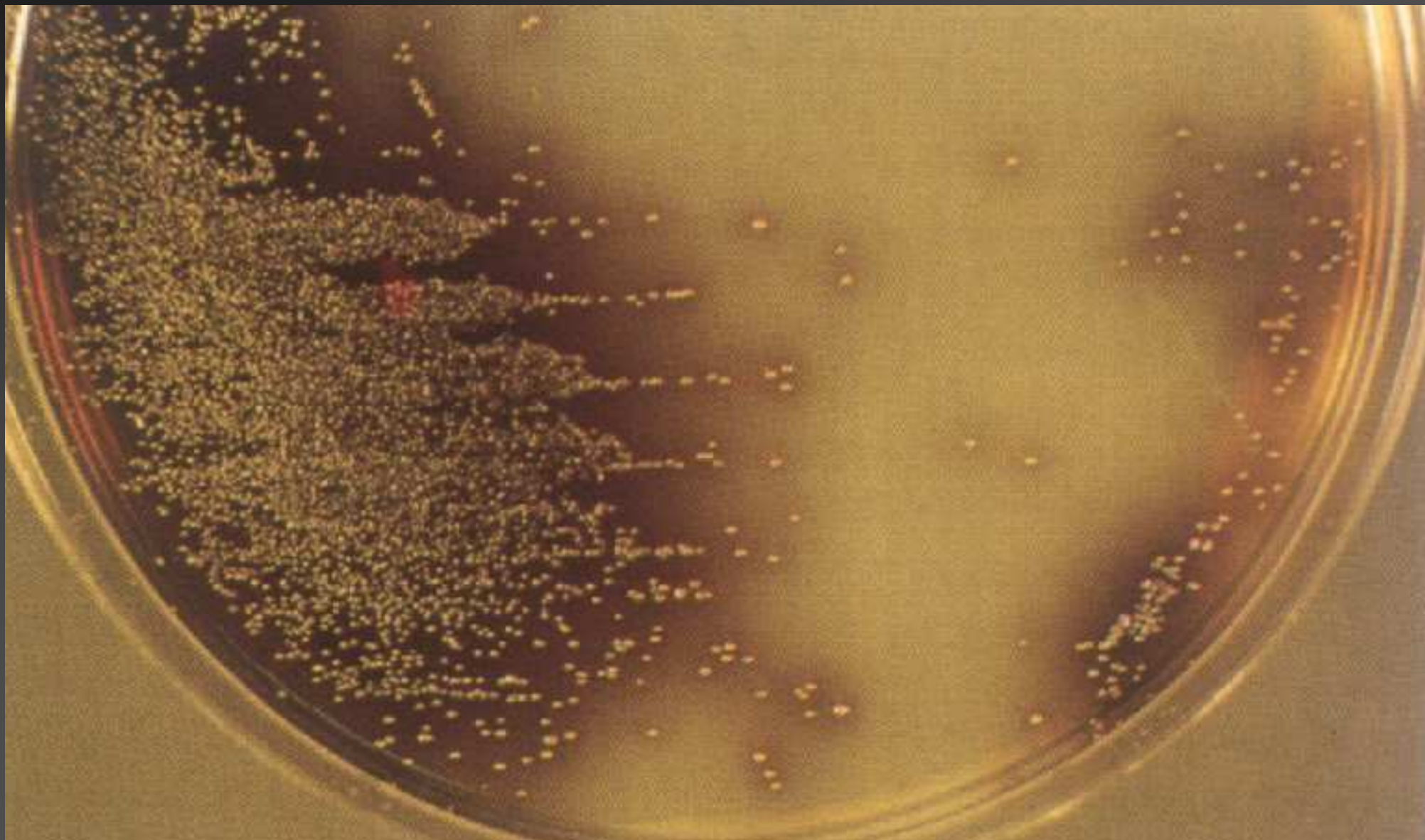
- Obarvěte podle Grama osm podezřelých kmenů (pro zopakování: natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem, poté barvit: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní obj.)
- Rozlišíte bakterie podle tvaru a typu buněčné stěny. Pro vzájemné rozlišení G+ koků a vzájemné rozlišení G+ tyčinek musíte pokračovat dál.

Úkoly 2 a), 2 b), 2 c), 2d): dopadení enterokoka



- V úkolu 2a odhalíme enterokoka růstem na půdě SB5 (Slanetz-Bartley). Kolonie jsou rezavé. Pozor, v protokolu je žluč-eskulin!
- V úkolu 2b popíšeme kolonie enterokoka. Jsou větší než většina streptokoků? Nemají pigment na rozdíl od stafylokoků? Ano? OK.
- V úkolu 2c rozlišíme enterokoky navzájem podle schopnosti štěpit arabinózu. Zelená–neg. – *E. faecalis*, žlutá – poz. – *E. faecium*
- V úkolu 2d určíme biochemicky i ostatní ent.

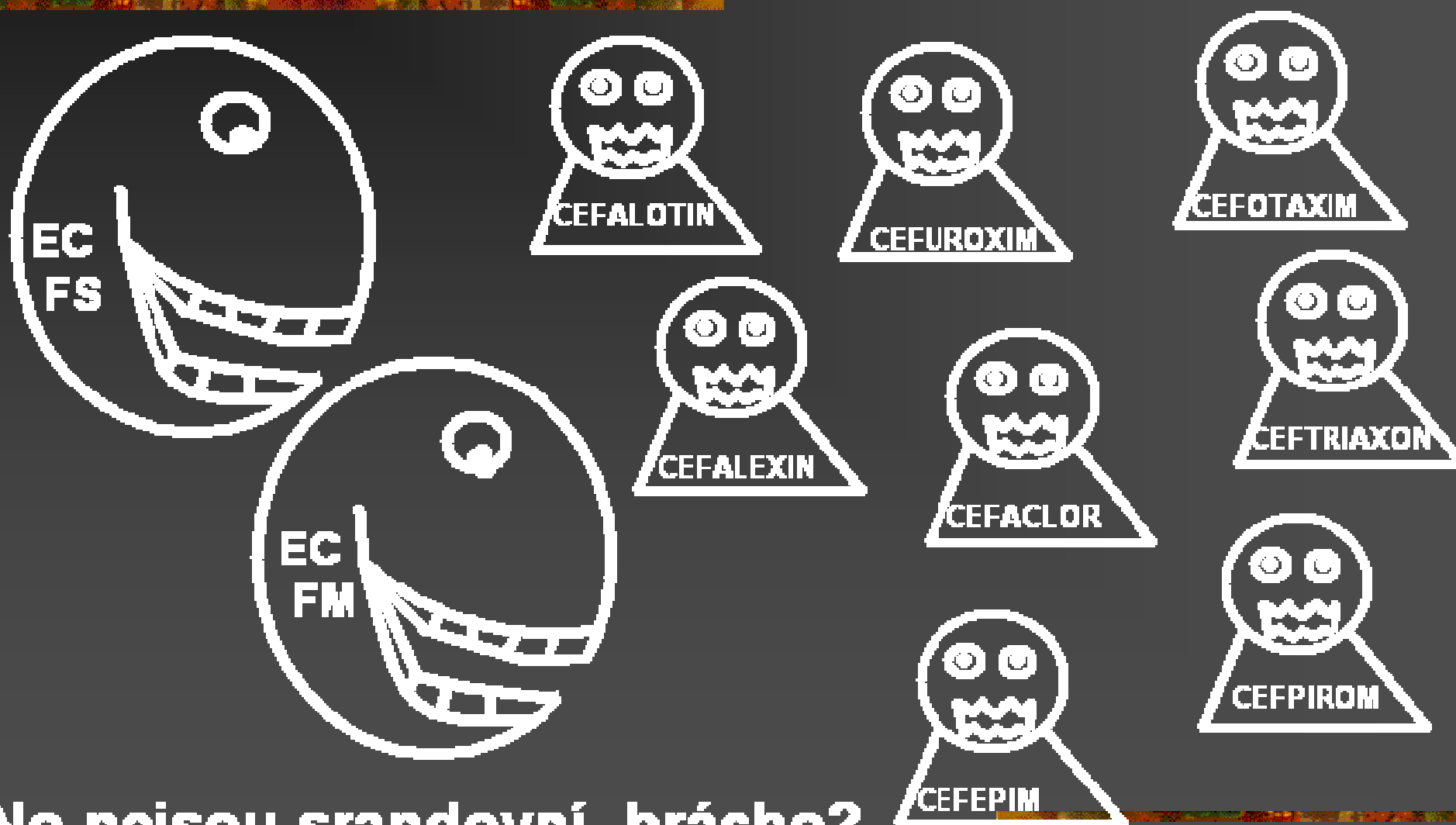
Žluč-eskulinový agar



2 e) – trest pro pachatele a jeho prověření

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

Takhle dopadá snaha vyzrát na enterokoka cefalosporinem...



No nejsou srandovní, brácho?

Tabulka zón citlivosti

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Ampicilin (rozšíř. penic.)	AMP	17 mm
Ko-amoxicilin (aminopnc*)	AMC	18 mm
Co-trimoxazol (směs 2)	SXT	16 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	15 mm
Chloramfenikol	C	21 mm
Vankomycin (glykopeptid)	VA	17 mm

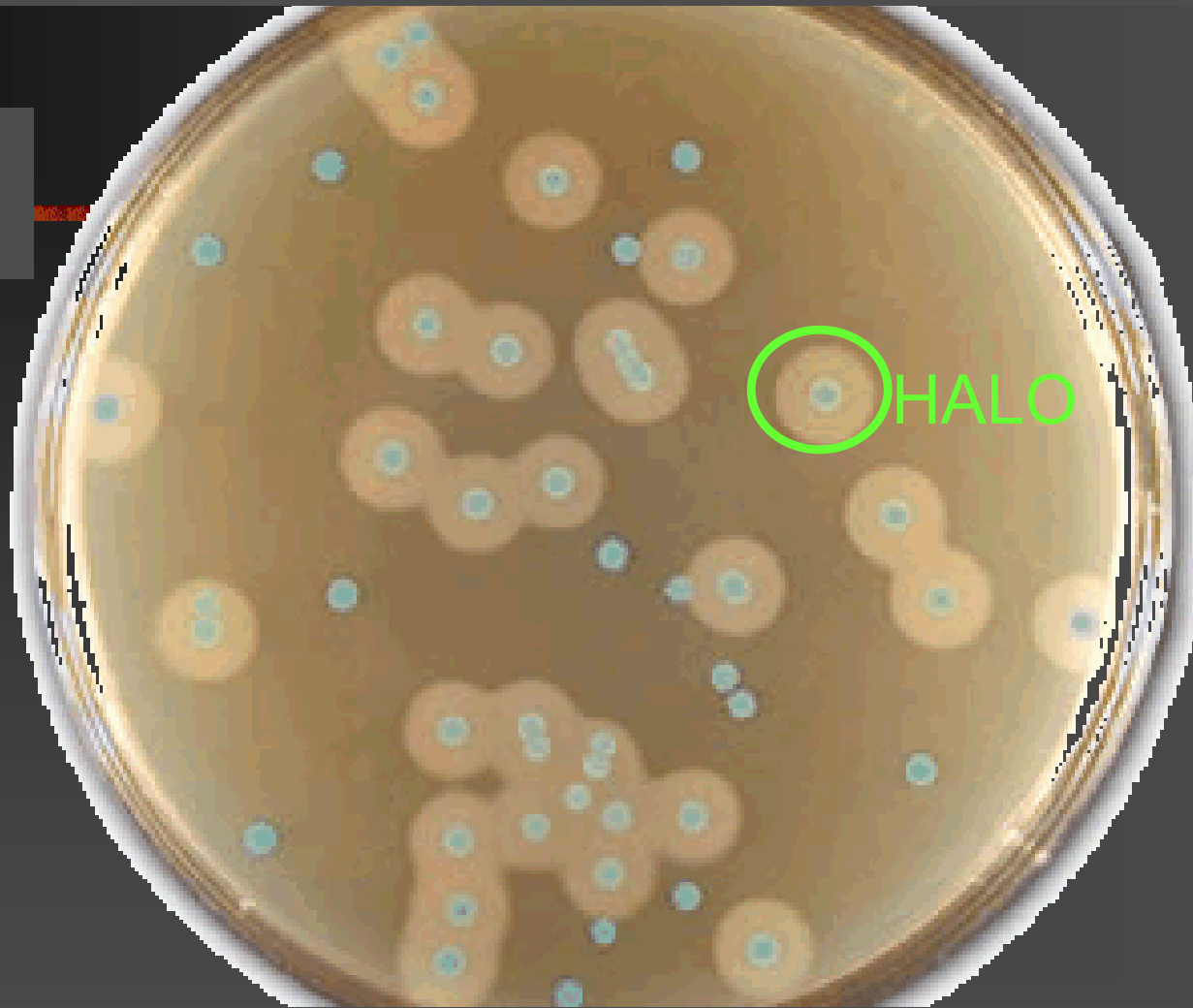
*Aminopenicilin potencovaný inhibitorem betalaktamázy

Úkoly 3 a 4: Grampozitivní tyčinky

- Pečlivě si v úkolu 3 prohlédněte a popište kmeny grampozitivních tyčinek (velikost kolonií, plst'ovitost, barva apod.)
- Proveďte či odečtěte jednotlivé testy popsané v úkolu číslo 4. Některé z nich (např. chromogenní půdy) máte demonstrovány na obrázku
- Chromogenní půdy obsahují nebarevný chromofor. Po odštěpení substrátu se zbarví.
- Úkol 4 d) se nedělá, škrtněte si ho prosím.

4c Chromogenní půda na listerie

ALOA



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).

Úkol 5 – trest pro pachatele a jeho prověření

- 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**

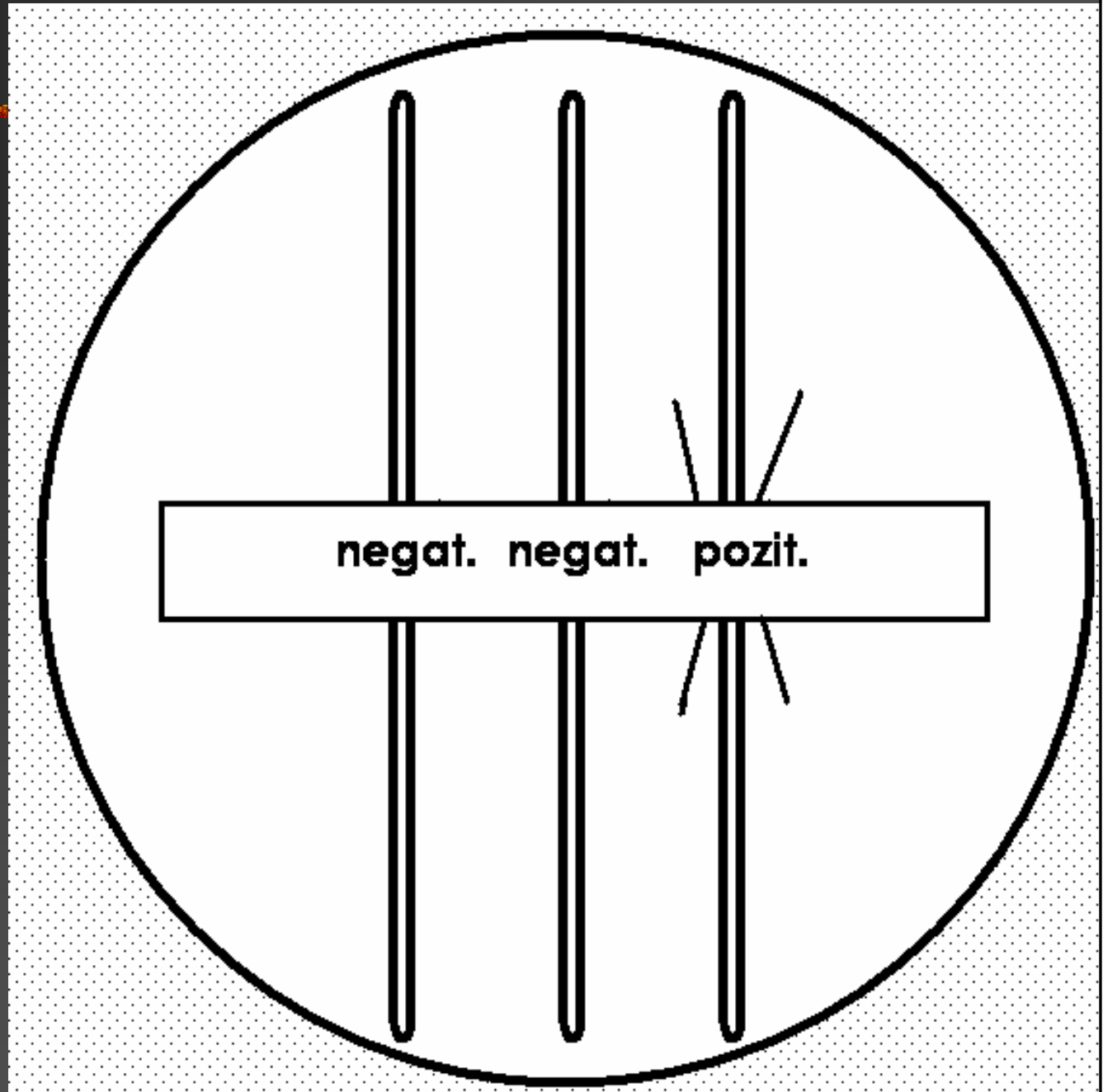
Tabulka zón citlivosti

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Ampicilin (rozšíř. penic.)	AMP	17 mm
Ko-amoxicilin (aminopnc*)	AMC	18 mm
Co-trimoxazol (směs 2)	SXT	16 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	15 mm
Chloramfenikol	C	21 mm
Vankomycin (glykopeptid)	VA	17 mm

*Aminopenicilin potencovaný inhibitorem betalaktamázy

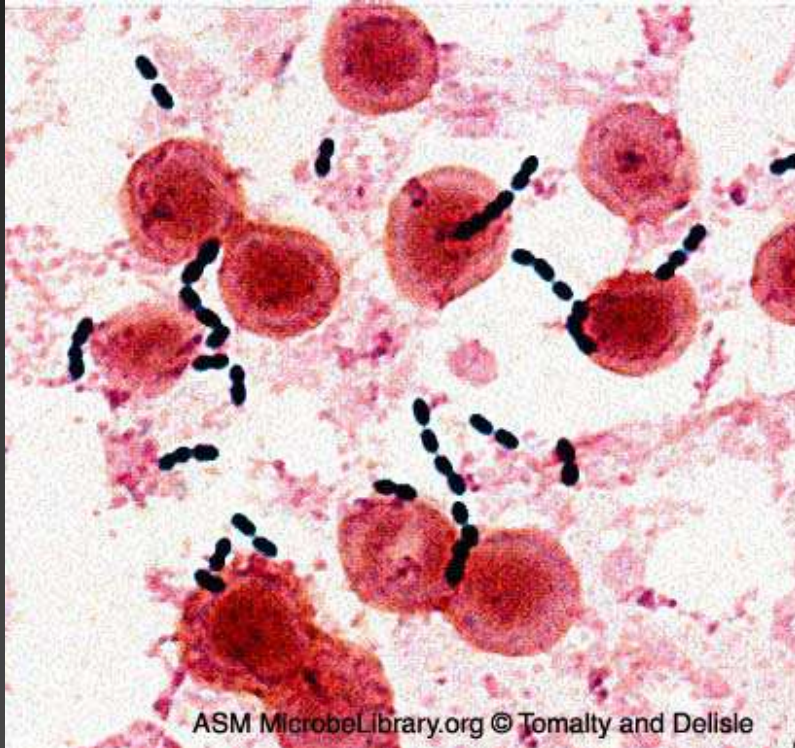
Úkol 6: Elekův test

- Je to test na průkaz toxinu záškrtového korynebakteria. Toxin je prokázán pomocí specifické protilátky.



Nashledanou při dalším dílu!

Použity obrázky z adres:



01 <http://textbookofbacteriology.net/Enterococcus.jpeg>

02 <http://www.lbl.gov/Science-Articles/Archive/images1/enterococcus.jpg>

03 04 <http://microbiology.mtsinai.on.ca/showcase/images/standard2.jpg>

06 <http://www.morgenwelt.de/typo3temp/5ce14d39b5.jpg>

07 08

<http://www.leighday.co.uk/upload/public/docImages/6/Baby%2520with%2520Listeria.jpg>

09 <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria>

10 http://www.territoire-belfort.gouv.fr/cps/sections/citoyen/sante/securite_alimentaire/suspicion_dintoxica/downloadFile/photo_3/listeria.jpg

11 <http://www.geocities.com/HotSprings/Spa/5276/listeria.jpg>

<http://www.geocities.com/HotSprings/Spa/5276/atlane1.htm>

12 <http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/images/d7115.jpg>

13 <http://womansday.ninemsn.com.au/img/food/myhealth/listeria.jpg>

14 <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Corynebacterium>

15 <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/images/Corynebacterium.jpg>

16 17 www.emedicine.com/MED/topic459.htm.

18 www.cykloturistika.cz/old/clanky/98/1/afrika.htm.

19 www.zilniklinika.cz/zily.htm.

20 www.waterscan.co.yu/viruses-and-bacterias.php....

21 www.cropsoil.uga.edu/~parrotlab/Bugs/index.shtml.