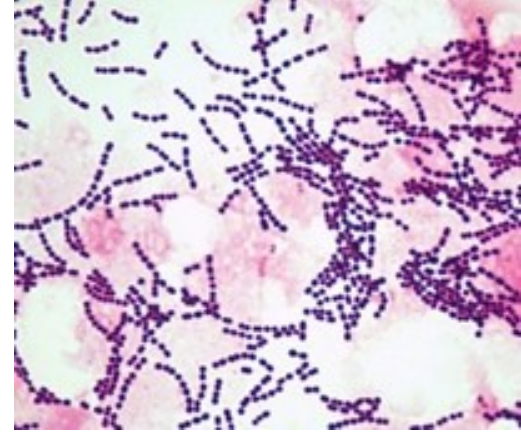


**P02**

**DIAGNOSTIKA  
STREPTOKOKŮ**

# Rod *Streptococcus*



- G+, katalasanegativní koky
- Tvoří dvojice či řetízky, nepohyblivé
- Kultivačně poměrně náročné bakterie
- Dělení dle hemolýzy (beta- hemolytické, viridující, nehemolytické)
- Dále dělení na antigenní skupiny (A-Z) dle Lancefieldové

# Přehled streptokoků



Změny na KA	
viridace (alfa)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	skupina „ústních streptokoků“
(beta) hemolýza*	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	Skupina „non-A-non-B“ streptokoků
žádná	Streptokoky bez hemolýzy („gamáči“)

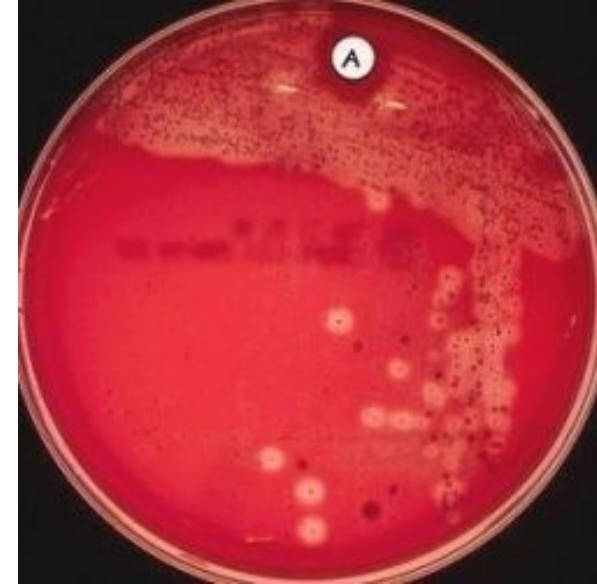
\*u *S. agalactiae* jen částečná hemolýza

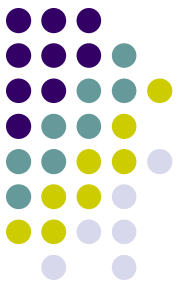
# *Streptococcus pyogenes*

*strepto* = v řetízcích, *pyo-genes* = hnisotvorný

*GAS*- group A streptococcus

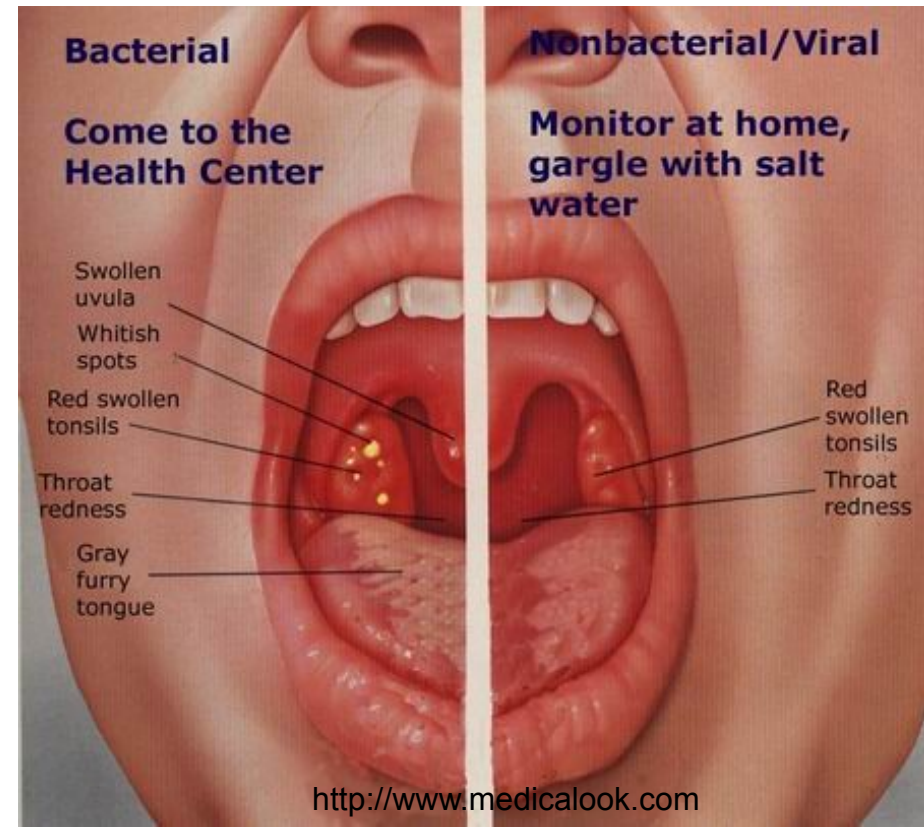
- Úplná beta-hemolýza, drobné kolonie, kultivačně náročné
- Původce angíny (akutní tonsilitidy)
- Způsobuje ale také hnisavé záněty tkání. Na rozdíl od abscesů, často způsobených stafylokoky, jde zde spíše o **flegmony**.
- Kromě angin má také na svědomí **spály**, **spálové angíny** a **erysipel** – **růži**. Jde o kmeny produkující tzv. **erythrogenní toxin** (erythros = řecky červený)





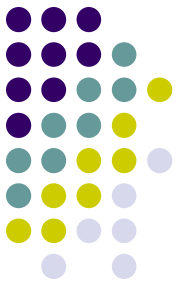
# Tonsilitis („angína“)

- Nejdůležitější a nejčastější bakteriální původce je *S. pyogenes*
- Jiní bakteriální či viroví původci
- Horečka, zduření podčelistních uzlin



# Spála

Pokud kmen produkuje exogenní pyrotoxiny-  
typická vyrážka a malinový jazyk



# Růže (erysipiel)

Ostře ohraničený zánět  
Na bérkách, v obličejí



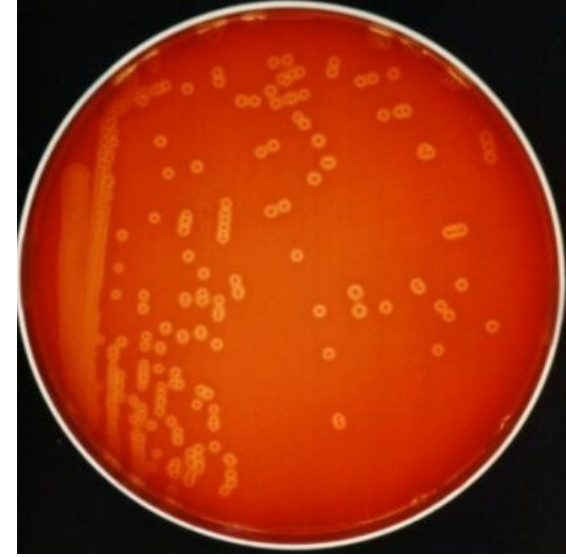
Kožní hnisavé infekce

Šířící se hnisavé infekce ran

Pneumonie, meningitidy

Sepse

# *Streptococcus agalactiae*

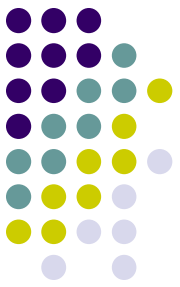


## *GBS- group B streptococci*

- větší kolonie, neúplná beta-hemolýza
- Tato bakterie způsobuje záněty mléčné žlázy s poruchou tvorby mléka, avšak většinou je to u krav.
- U člověka se specializuje spíše na dolní část těla (**urogenitální infekce**), s možným postižením dítěte při porodu (novorozenecké meningitidy a sepse)



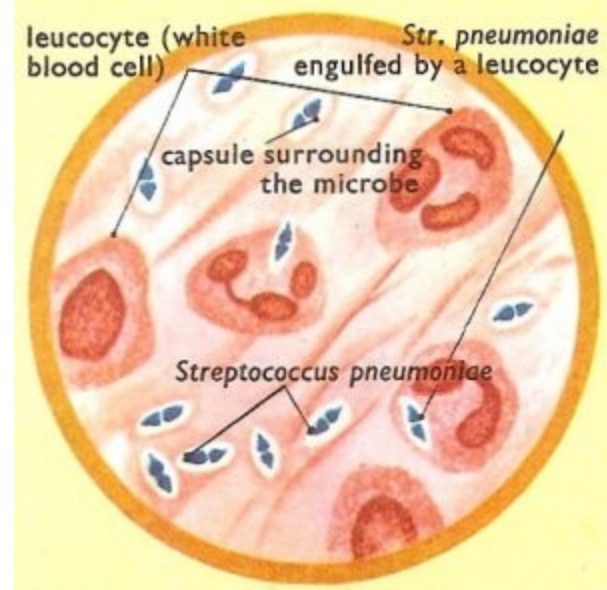
# „non-A-non-B“ streptokok

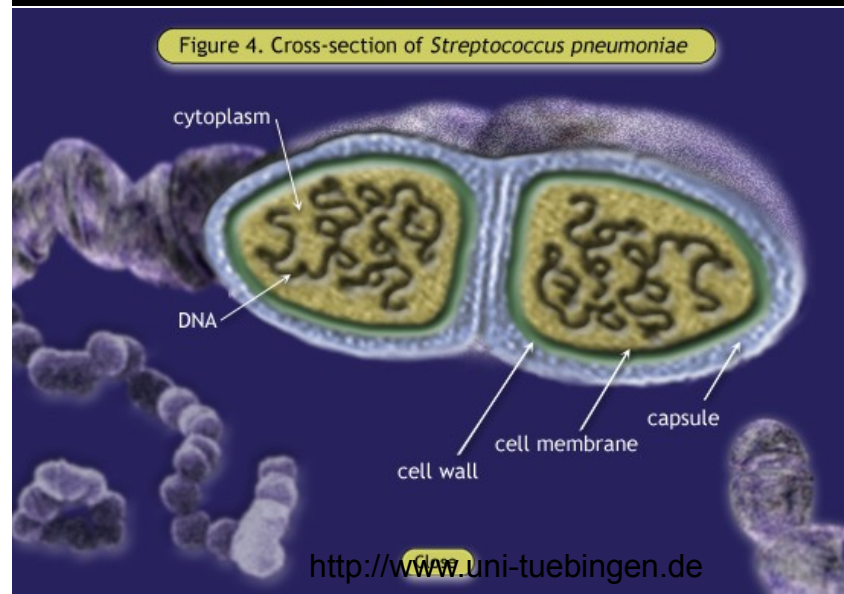
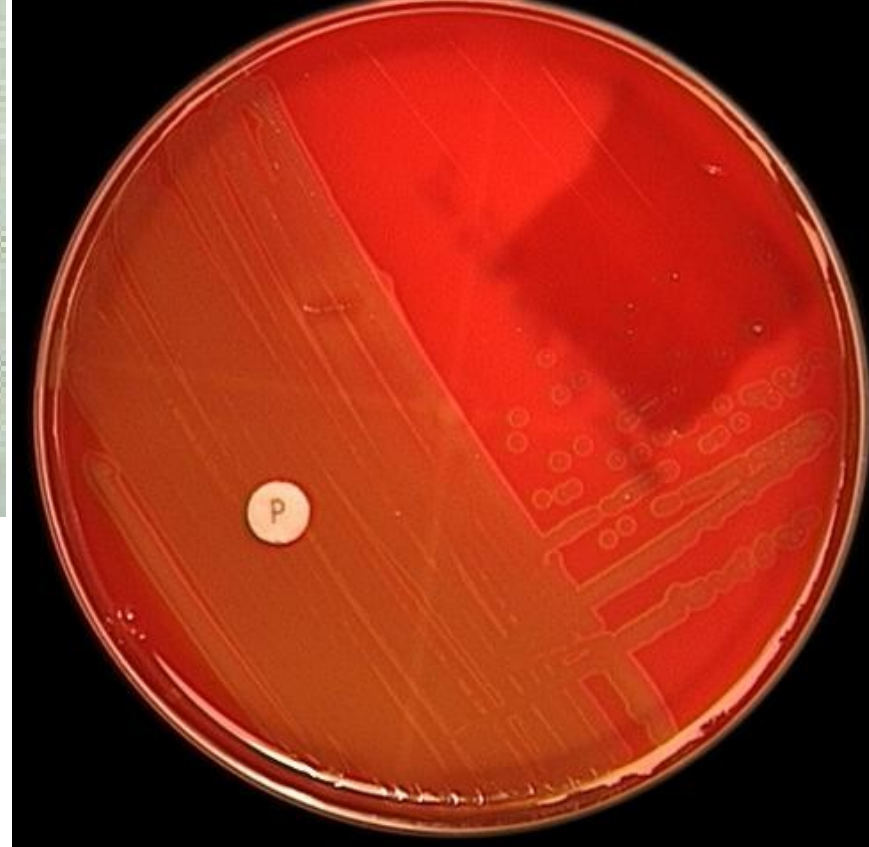
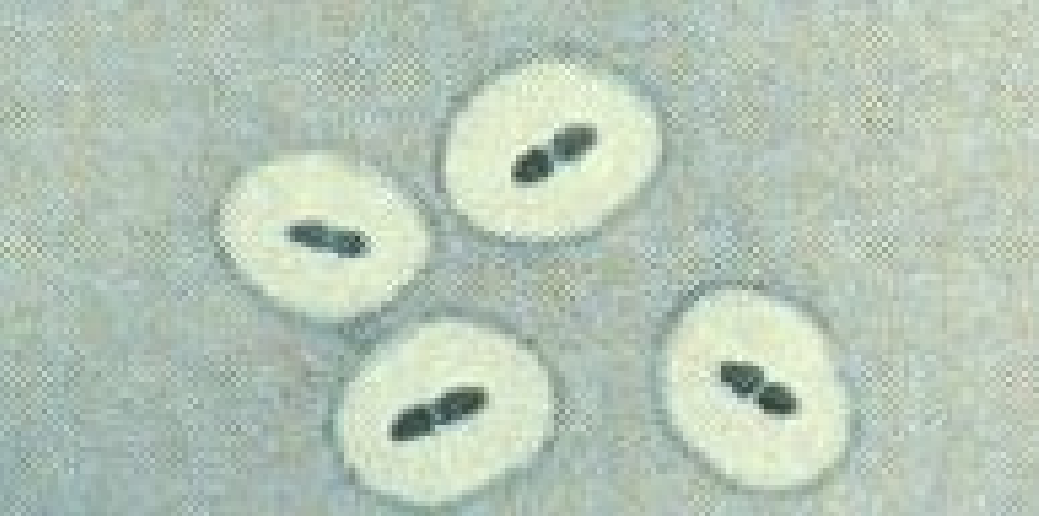


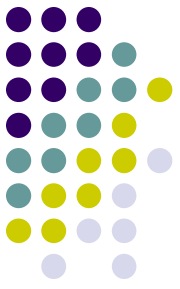
- Říkáme jim tak proto, že nepatří ani do skupiny A (ve které je *Streptococcus pyogenes*) ani do skupiny B (kde je *S. agalactiae* a některé zvířecí streptokoky).
- Nezpůsobují tak často angíny, ale spíše **faryngitidy** – **záněty hltanu**. Často však mohou být přítomny v krku bez klinických potíží.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

# *Streptococcus pneumoniae*

- čili „pneumokok“. Dříve se mu říkalo *Diplococcus pneumoniae*, tvoří totiž řetězky, ale jen dvojice.
- Tvar buněk není ideálně kulatý, má spíše lancetovitý (kopíčkovitý) tvar. Opouzdřené buňky
- Hlenovité bezbarvé kolonie (kapky oleje), nebo v R- fázi (tvoří pouzdro), alfa-hemolýza

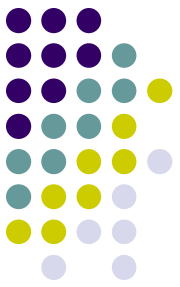






- V malém množství se nachází i ve farynzích zdravých osob.
- Jinak je ale původcem zánětů plic, paranasálních dutin, středního ucha, a také původcem sepsí a meningitid.
- Očkování

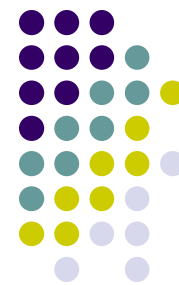
# Viridující streptokoky



- **Neboli ústní streptokoky, alfa streptokoky,** – všechny tyto pojmy označují skupinu streptokoků, které **na krevním agaru viridují**; obvykle se 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 (např. poškozené srdeční chlopně)

# Viridující streptokoky





# Léčba

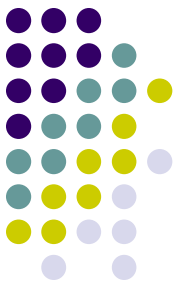
- U streptokoků je stále lékem volby klasický **penicilin**.
- **Makrolidy** se používají u prokázané alergie na penicilin.
- Mezi léky další volby patří **doxycyklin**, **ko-trimoxazol**, **ampicilin** a další.
- **Vankomycin** je rezervní, zatím stoprocentně účinné atb (žádná zóna = chyba, nejde o streptokoka)



# Přehled metod

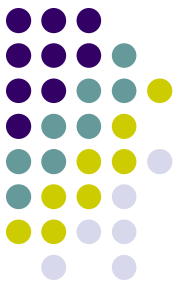
- **Přímé metody** jsou mikroskopie, kultivace, biochemické identifikační metody, průkaz antigenu, průkaz DNA, pokus na zvířeti apod.
- Přímé metody aplikujeme na **vzorek** (přímý průkaz ve vzorku) nebo na **kmen** (identifikace izolovaného kmene)
- **Nepřímé metody** jsou ty, kterými prokazujeme protilátky





# Diagnostika streptokoků

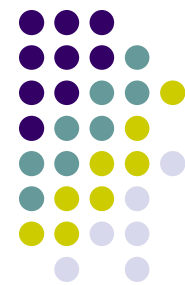
- **Mikroskopie:** grampozitivní koky
- **Kultivace:** na KA kolonie šedé až bezbarvé, většinou drobné, větší kolonie má *Streptococcus agalactiae*
- **Hemolytické vlastnosti:** některé viridují, některé částečně či úplně hemolyzují
- **Nerostou** na KA s 10 % NaCl, ani na Slanetz-Bartleyově či žluč-eskulinové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



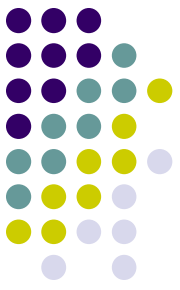
# Diagnostika-2

- **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.

# Diferenciální diagnostika 1



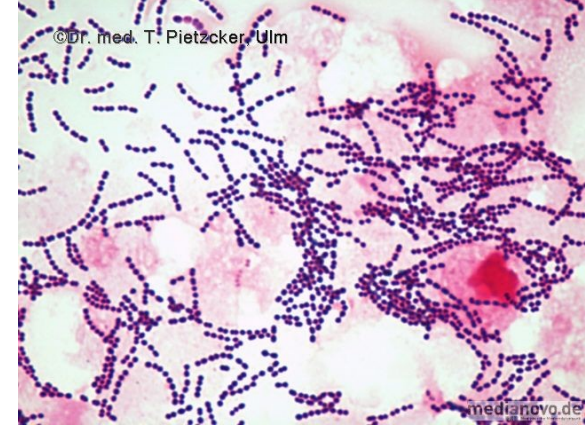
- Gramovo barvení odhalí všechny bakterie, které nepatří mezi grampozitivní koky.
- Pozitivní kataláza od streptokoků odliší stafylokoky
- Růst na SB a ŽE půdě odhalí enterokoky, které jsou také všechny pozitivní v takzvaném **PYR-testu**, kdežto streptokok je pozitivní jen jeden (*S. pyogenes*)



# 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:



Neznámá bakterie

G+ kok

Jiné

Streptokok

Stafylokok

Enterokok

Streptokok s viridací

Streptokok s hemolýzou

Streptokok bez hemolýzy

Pneumokok

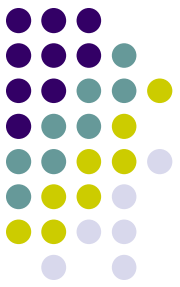
*S. pyogenes*

*S. agalactiae* (SAG)

Ústní streptokok

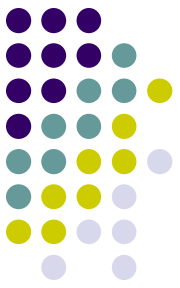
Streptokok non-A-non-B

# Úkol 1: barvení kultur podle Grama



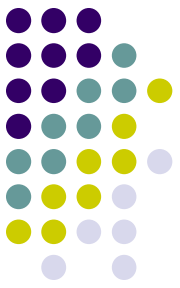
- Obarvěte podle Grama osm kmenů (pro zopakování: natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem, poté barvit: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní obj.)
- Jeden kmen vyloučíte snadno: bude to G- tyčinka. Další tři budou G+ koky a spolehlivě je tedy mikroskopií nedokážete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

# Úkol 2



- 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**. Dříve se používala půda **žluč eskulinová**. Obě půdy jsou prakticky rovnocenné.

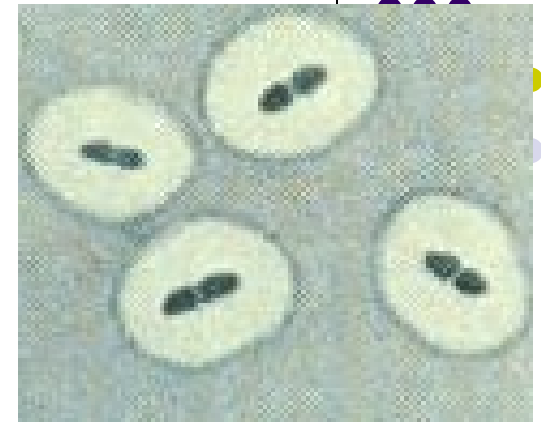
# Úkol 3: Popis kolonií streptokoků na KA



- Pečlivě si prohlédněte a popište 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



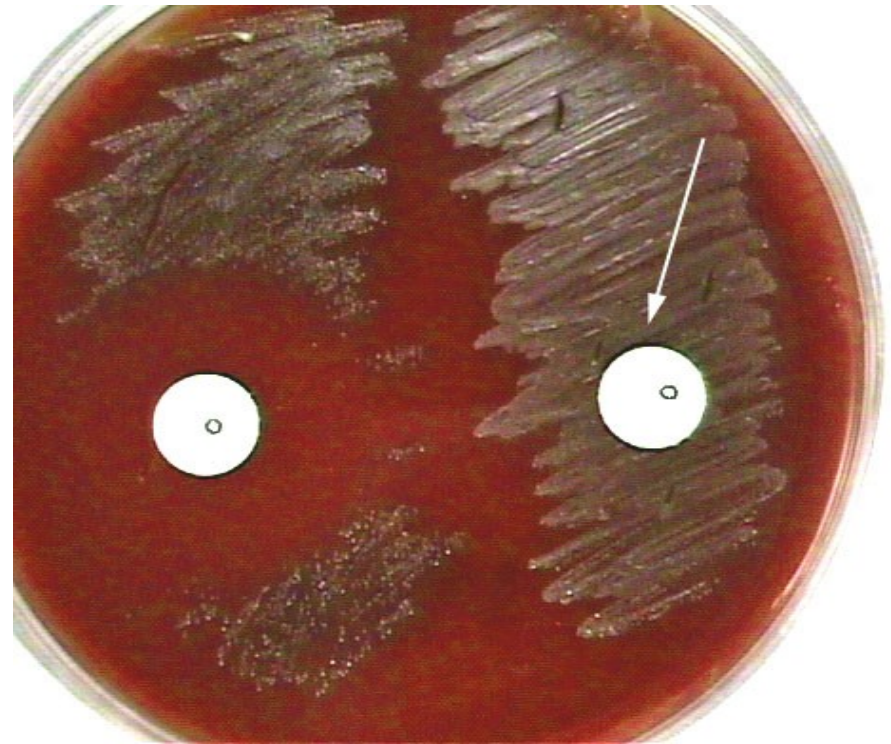
- Pneumokoka **odlišíte** optochinovým testem – viz další obrazovka.
- **Podezření** však můžete pojmut, když:
  - mikroskopicky vidíte **lancetovité diplokoky**
  - kultivačně jsou kolonie **ploché, penízkovité až miskovité**, někdy s centrálním vyvýšením
  - někdy naopak jsou kolonie výrazné, **hlenovité**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

# Úkol 4a: Optochinový test

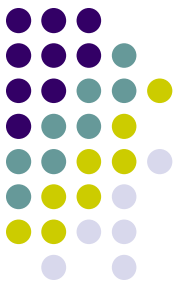


- Klasický test k odlišení pneumokoka od ústních streptokoků. Pneumokok je citlivý na antibiotikum optochin, ústní streptokoky jsou rezistentní. (Optochin se dnes už nepoužívá léčebně, zůstal tedy jen v diagnostice)

Občas se používá také test rozpustnosti ve žluči.



# Úkol 4b: Druhové určení ústního streptokoka

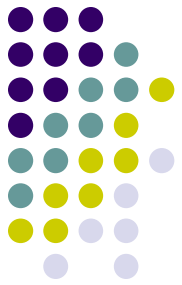


- Jen blázen (nebo badatel, což je někdy totéž😊) by druhově určoval ústního streptokoka z ústní dutiny nebo krku. Proč to činit, když je v těchto místech běžnou flórou?
- Na druhou stranu, máme-li kmen z hemokultury či likvoru, je jeho určení na místě. U viridujících streptokoků nemá smysl snažit se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

# STREPTOtest 16 – jak odečíst



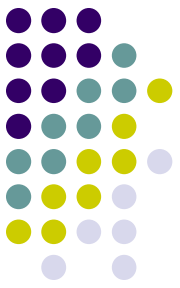
- První reakcí je opět VPT
- Druhou až devátou reakcí je opět první řádek v dvojřádku
- Obdobně desátou až sedmnáctou reakcí je druhý řádek v dvojřádku



# Kód 511 420 *Streptococcus salivarius*

% pravd. 97,19 Index typičnosti 1,00

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
	Zkum	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	
	Zkum	První řádek panelu								Druhý řádek panelu								
+																		
-																		
?																		
	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	
	1	<del>2</del>	4	1	<del>2</del>	<del>4</del>	1	<del>2</del>	<del>4</del>	<del>1</del>	<del>2</del>	4	<del>1</del>	2	<del>4</del>	<del>1</del>	<del>2</del>	
		5			1			1			4			2			0	

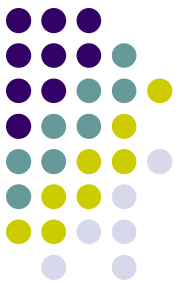


# Úkol 5a PYR test

- **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 byl stejný jako optochinový jen se použilo jiné antibiotikum. Dnes byl pro menší spolehlivost opuštěn.*



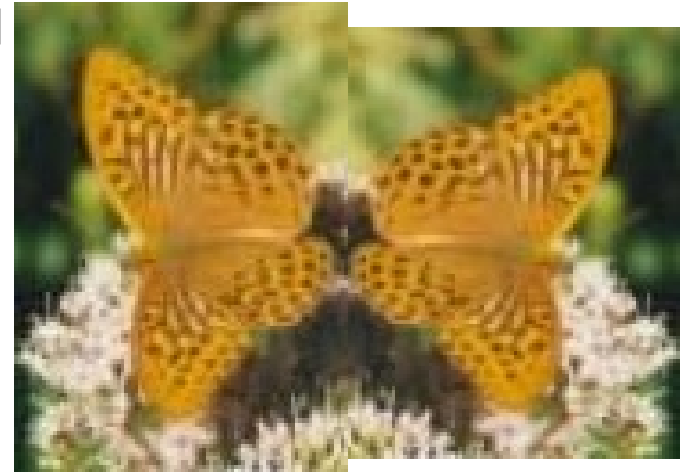
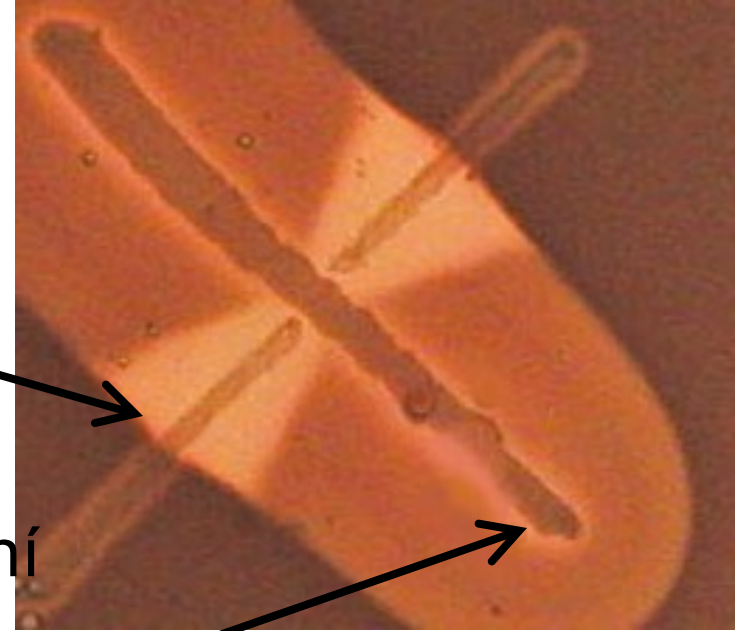
# *Streptococcus agalactiae*- CAMP test



- 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**

# Úkol 5 b: CAMP test

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





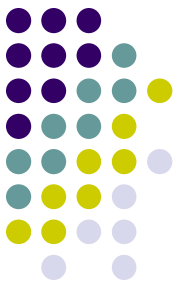
# Shrnutí



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

\*v případě potřeby se blíže identifikuje průkazem antigenu

# Úkol 5c- Latexová aglutinace

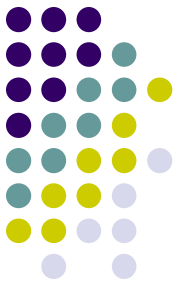


**Praktický test: lahvičky  
se směsí antibiotik  
a latexových částic**

**Na obrázku určete,  
s kterým sérem  
testovaný  
kmen aglutinuje  
(vypadá jinak, než  
ostatní).**



# Zapamatujte si:

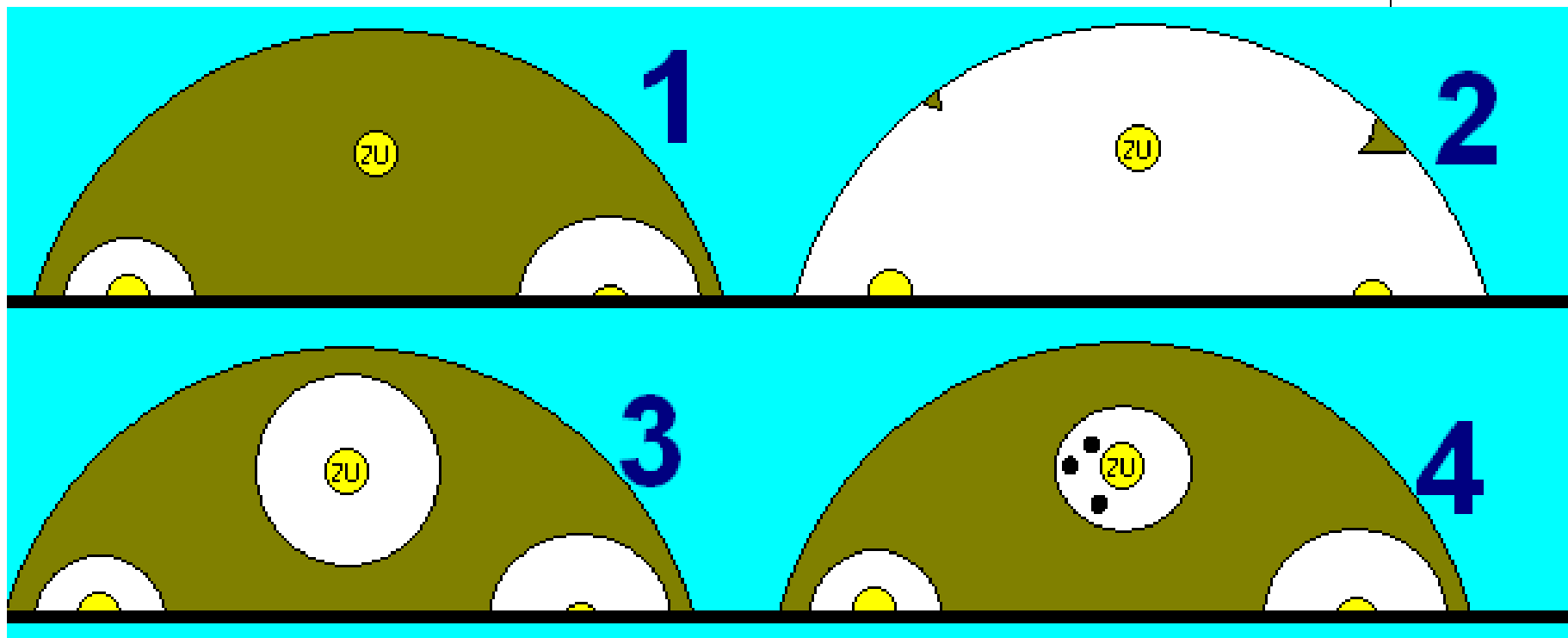
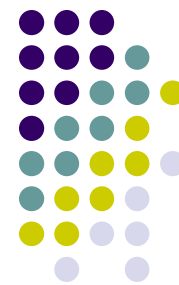


**Streptokoky s hemolýzou** (úplnou nebo částečnou), ale také streptokoky zcela bez hemolýzy mohou být zpravidla určovány **latexovou aglutinací** (je-li to zapotřebí). Jejich biochemická aktivita je zpravidla chabá.



**Streptokoky s viridací** (alfa-streptokoky) lze zpravidla dále určovat **biochemickými testy** (je-li to zapotřebí). Jejich antigenní determinanty jsou zpravidla slabé

# Jak odečítat testy citlivosti



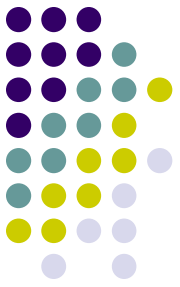
1 – žádná zóna, lze bez měření rovnou zapsat „R“

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, jako by neexistovala

# Úkol 6: testy citlivosti na ATB



- Odečtěte 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!*

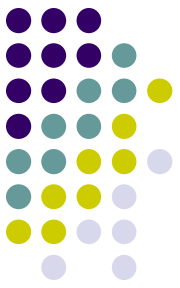


# Test citlivosti na streptokoky

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

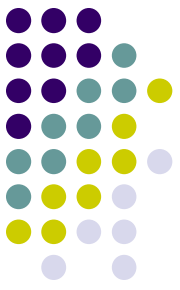
*Klindamycin se běžně testuje, vy ho však ve své sestavě nemáte!*

# Pozdní následky streptokokových infekcí



- Po každé streptokokové infekci se objevují protilátky, včetně protilátek proti streptokokovému toxinu-**streptolyzinu O**
- Někdy se stane, že množství těchto protilátek po infekci neklesá, ale naopak stoupá, omylem se místo na streptokoky **vážou na některé struktury organismu.**
- V takovém případě jsou tedy nebezpečnější protilátky než samotný patogen
- Indikací k vyšetření je podezření na tzv. **pozdní následky streptokokových infekcí** (akutní glomerulonefritida a revmatická horečka)

# 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.

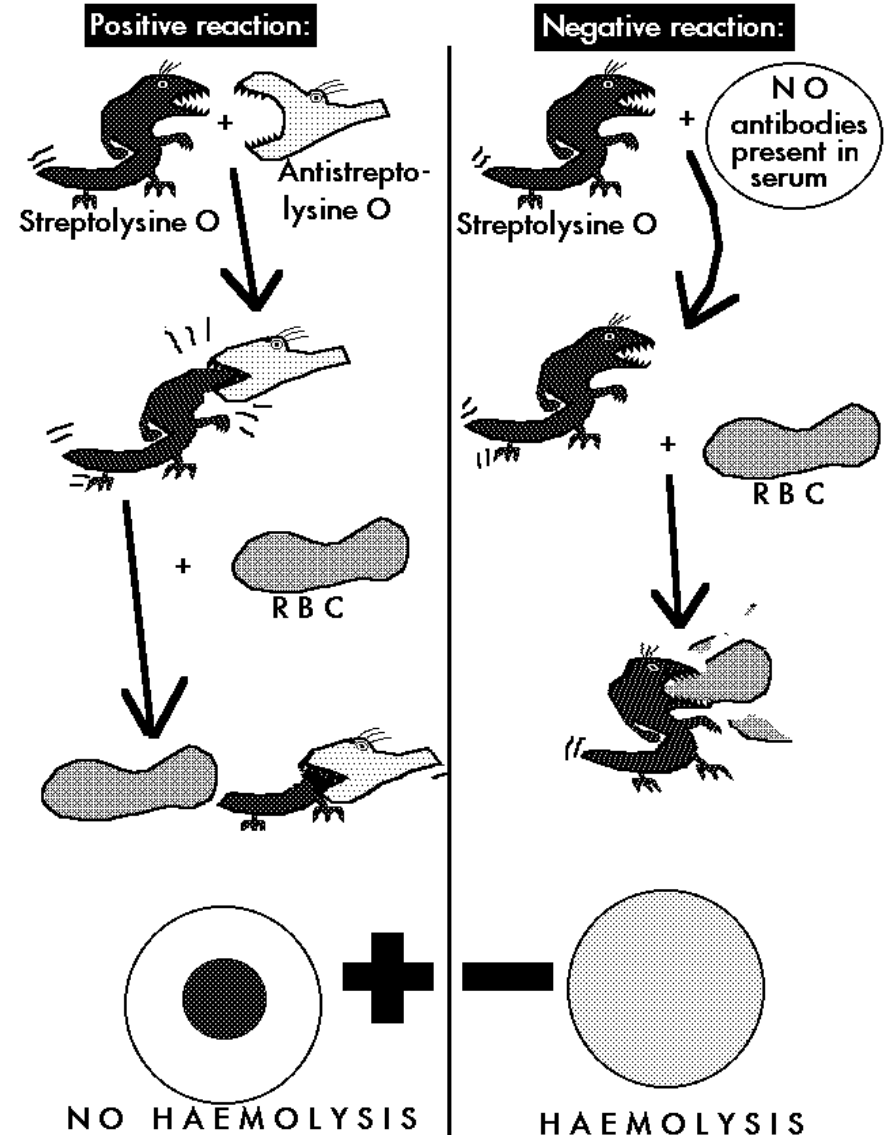


# Detection of ASO

Anti Streptolysine O

## Princip vyšetření ASLO: neutralizace hemolýzy

Všimněte si, že v angličtině se ASLO označuje jako ASO. Zrada je, že zkratka ASLO přitom také existuje a označuje stafylolyzin.



# ASLO- princip



- Protilátka blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolyzin O) na krvinku. **Pozitivní** je tedy **zábrana hemolýzy** se sedimentací krvinek (podobně jako u KFR, ale ze zcela jiného důvodu)
- **Panel** s pozitivní kontrolou a sedmi pacienty, ředění s koeficientem pouze 1,2
- **Titř** nad cca 200 znamená riziko, že pacient je ohrožen pozdním následky streptokokové infekce

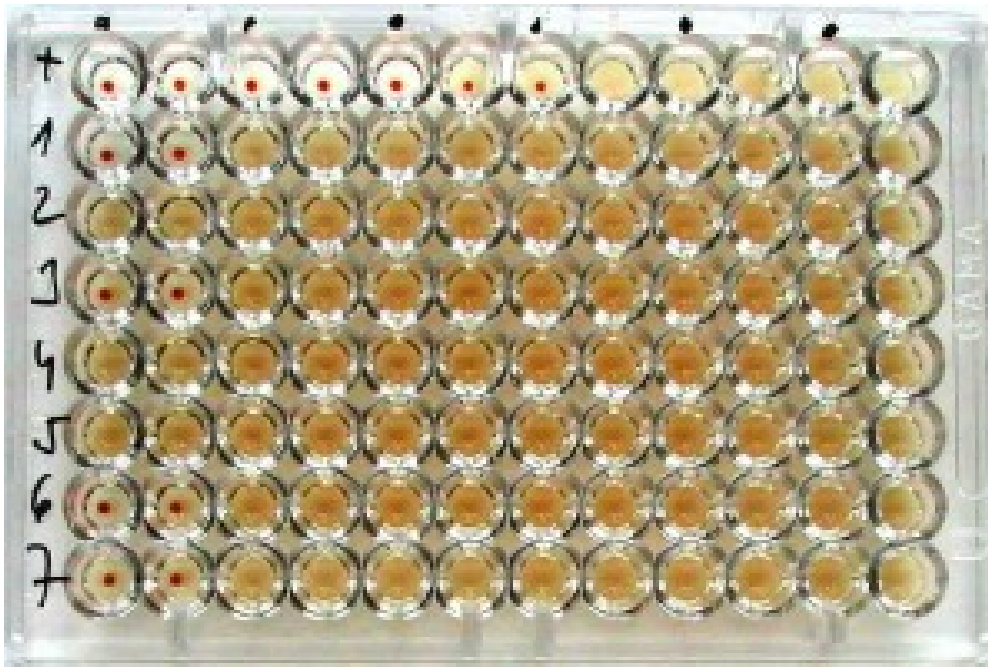
## Hodnocení výsledků ASLO

jam ka č:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
hod nota titř.	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911

# Úkol 7: Odečtete panel ASLO



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



- Panel se odečítá naležato. Obsahuje pozitivní kontrolu a 7 pacientů.