



Další grampozitivní bakterie

P03

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



■ 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

- Které streptokoky s hemolýzou jsou významné?

S. pyogenes a *S. agalactiae*

- Jak poznáme prvního z nich?

Pozitivním PYR testem

- A jak odlišíme toho druhého?

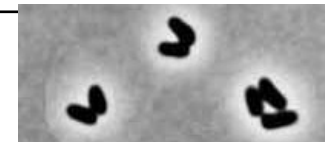
CAMP testem – testem hemolyt. synergismu

- Dá se tímto testem hledat i zlatý stafylokok?

Nedá – ne každý produkuje příslušný hemolyzin

Klinicky významné G+ bakterie

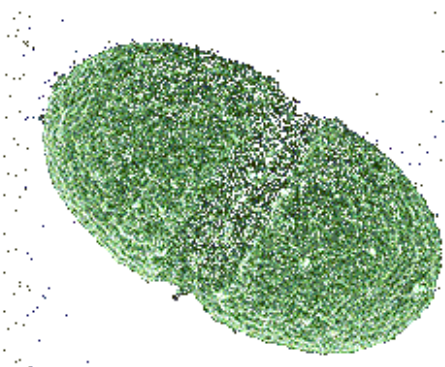
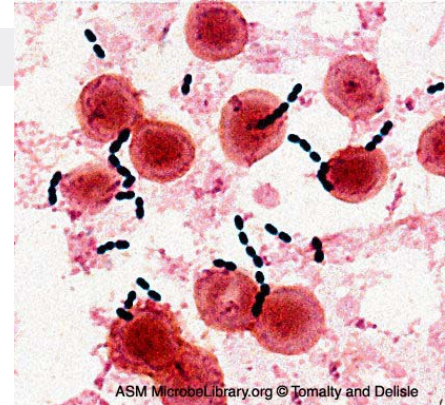
Tvar	
Lékařsky významné Koky	Stafylokoky (<i>S. aureus</i> , koag. - staf.)
	Streptokoky (s viridací, hemol., bez)
	Enterokoky (<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>)
Lékařsky významné Tyčinky	Listerie (typicky <i>L. monocytogenes</i>)
	Korynebakteria
	Bacily



Listerie a korynebakteria nesporulují, bacily sporulují

Rod *Enterococcus*

- G+ koky v drobných shlucích či krátkých řetízcích
- Vysoká odolnost – 6,5 % NaCl, žluč, azid sodný, pH 4,8 - 11
- Jak napovídá rodové jméno – součástí normální mikroflóry střeva.
- Jsou jedním z nejběžnějších původců močových infekcí
- Nozokomiální infekce (rány, sepse, endokarditidy, implantáty aj.)
- Primární rezistence k cefalosporinům
- Nejčastěji *E. faecalis* (90%),
E. faecium a další

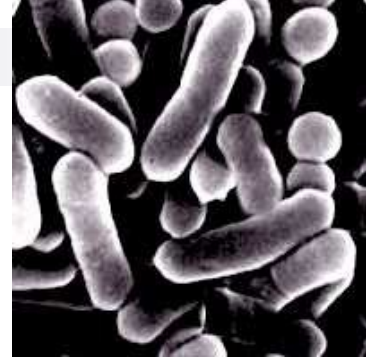


Enterokoky – vzhled kolonií



Rod *Listeria*

- G+ krátké tyčinky vyskytující se v prostředí a potravinách (sýry, zelenina, půda, listí...),
- Vyznačují schopností růst při nízkých teplotách (4 °C) (pohyb) a vysokých koncentracích NaCl či žluči
- Kataláza +
- *L. monocytogenes*, *L. ivanovi*, *L. innocua* aj.



Listeria

Listerióza (*L. monocytogenes*)

- zřídka vyvolává viditelné infekce dospělých, snad s výjimkou uzlinového syndromu
- je však nebezpečná pro těhotné a novorozence (bakteriémie, meningitida, penumonie), a pro oslabené osoby (infekce ran, sepse, meningitidy)



Korynebacteria

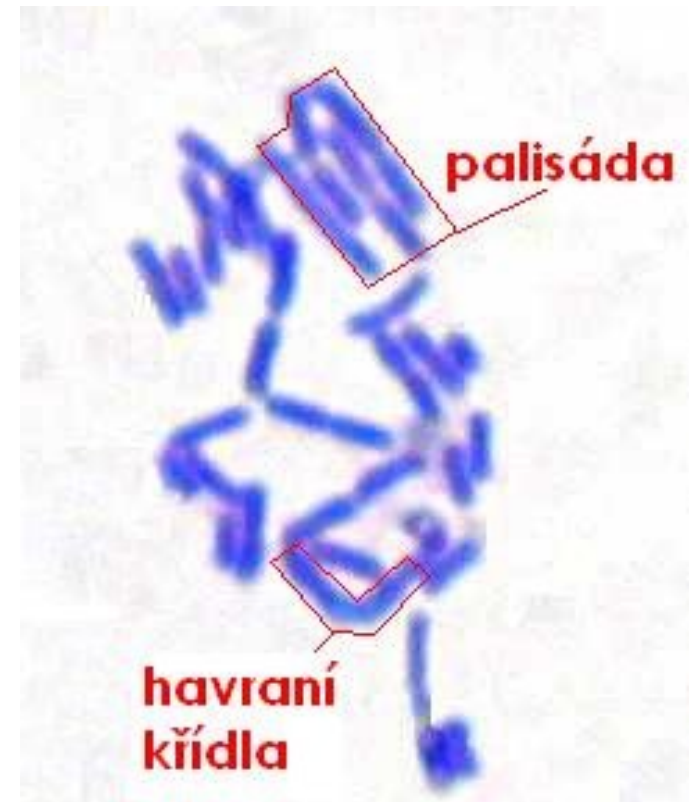
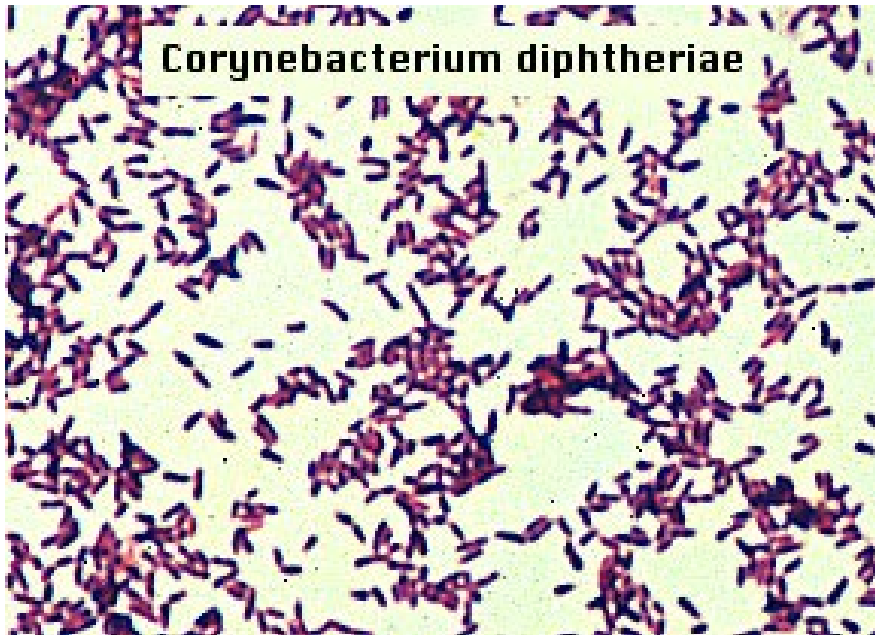
- Korynebakteria jsou G+ tyčinky kyjovitého tvaru (koryné = kyj), některá jsou pleomorfní (různotvará), popřípadě i nekonstantně probarvená (gramlabilní)
- Odolné k vyschnutí a koncentraci NaCl, nerostou však na MH bez krve
- Kataláza +
- Patří sem ***C. diphtheriae*** -původce záškrtu, dnes díky očkování u nás vzácný
- Skupina tzv. **nedifterických** (= nezáškrtočných) – jsou normální součástí běžné flóry na kůži, spolu se stafylokoky a kvasinkami
Corynebacterium jeikeium – nozokomiální inf.

Záškrť

Pseudomembranózní angína (pablány, otok)
Záškrť vzniká pouze pokud kmen produkuje
difterický toxin

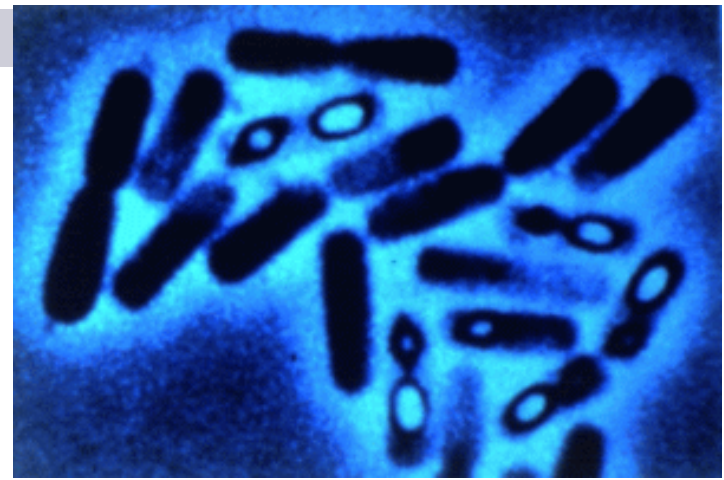


Korynebakteria- tvary



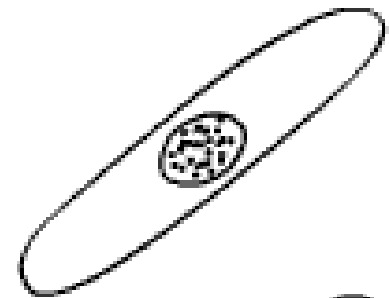
Rod *Bacillus*

- G+ mohutné tyčinky s rovnými konci
- Tvoří jednu endosporu, pohyblivé
- Kataláza +
- Většina příslušníků rodu *Bacillus* jsou neškodné mikroby, jejich spóry se vyskytují ve vnějším prostředí. Pokud se vyskytnou v kultivaci klinického vzorku, jde pravděpodobně o kontaminaci



Jsou však i bacily stojící za zmínku

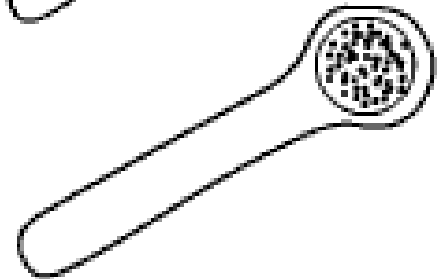
- *Bacillus anthracis* se stal populárním při teroristických hrozbách. Obligátní patogen, původce veterinárního onemocnění – **antraxu** – byl jednou z prvních nákaz, proti nimž byla zkoušena (Pasteurem) vakcinace.
- *Bacillus cereus* je původcem enterotoxikóz a infekcí oka. U imunokompromitovaných osob – infekce ran, endokarditidy, sepse.
- *Bacillus stearothermophilus* a *Bacillus subtilis* se vzhledem ke své schopnosti přežít 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)



Léčba infekcí způsobených enterokoky a G+ tyčinkami

- Na **enterokoky** ani na **listerie** 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**.

VRE

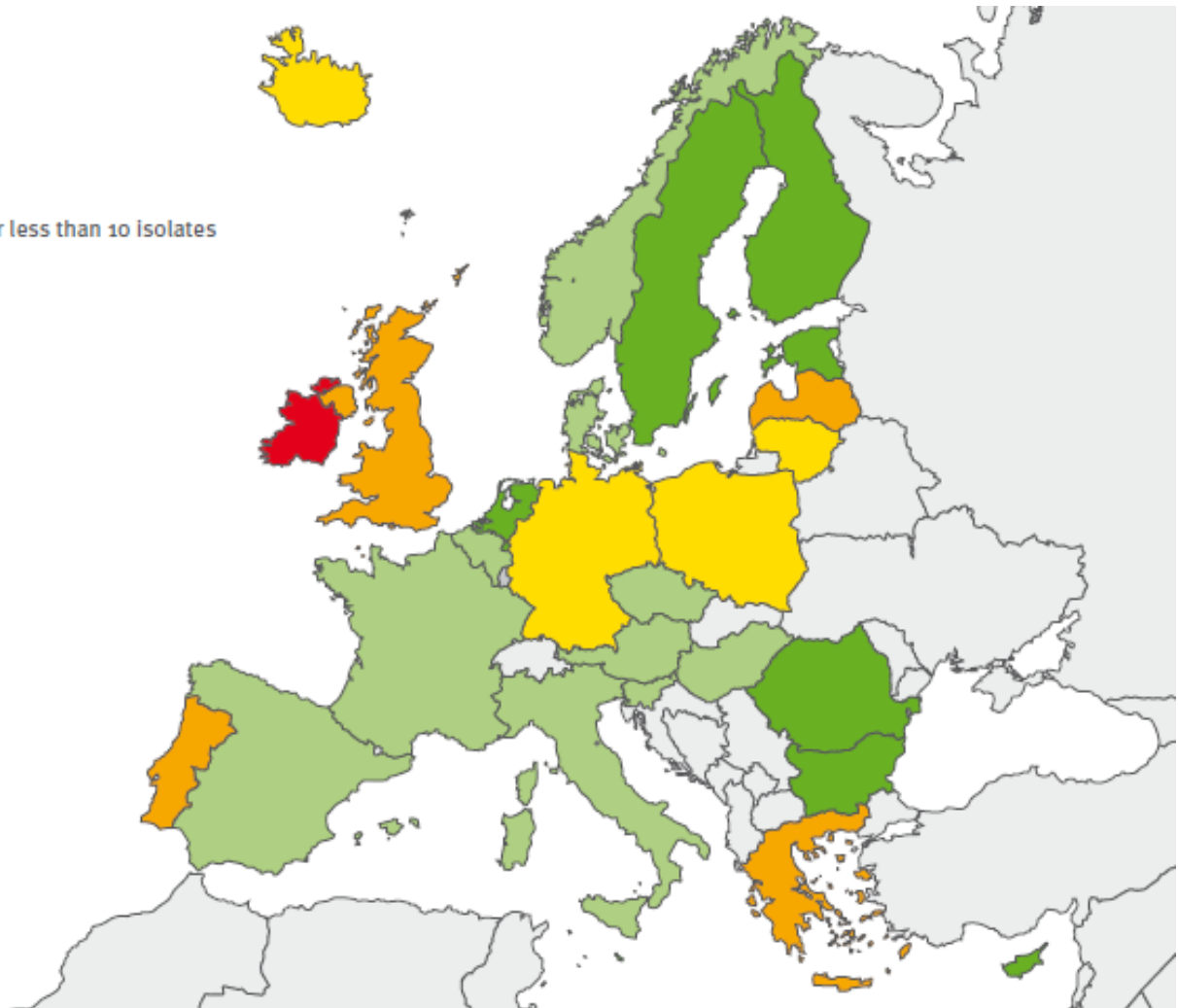


Table 5.4: Number of invasive *E. faecalis* and *E. faecium* isolates and proportion of high-level aminoglycoside-r

Diagnostika

	Enterokok	Listerie	Koryneform.	Bacillus
Mikroskopie	<p>G+ koky v krátkých řetězcích</p>  <p>http://textbookofbacteriology.net</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>

Diagnostika- 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
- Citlivost lze testovat na běžném MH agaru. Existují i půdy na screening VRE

Diagnostika-G+ tyčinky

- Biochemické testy: kataláza u všech tří pozitivní. Biochemicky lze rozlišovat koryneformní tyčinky navzájem (API Coryne, Remel)
- Růst při nízkých teplotách a vysokých koncentracích NaCl se používají v diagnostice *listerií*
- Průkaz antigenu – například průkaz difterického toxinu Elekovým testem

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 jiné

Úkol 1: 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.

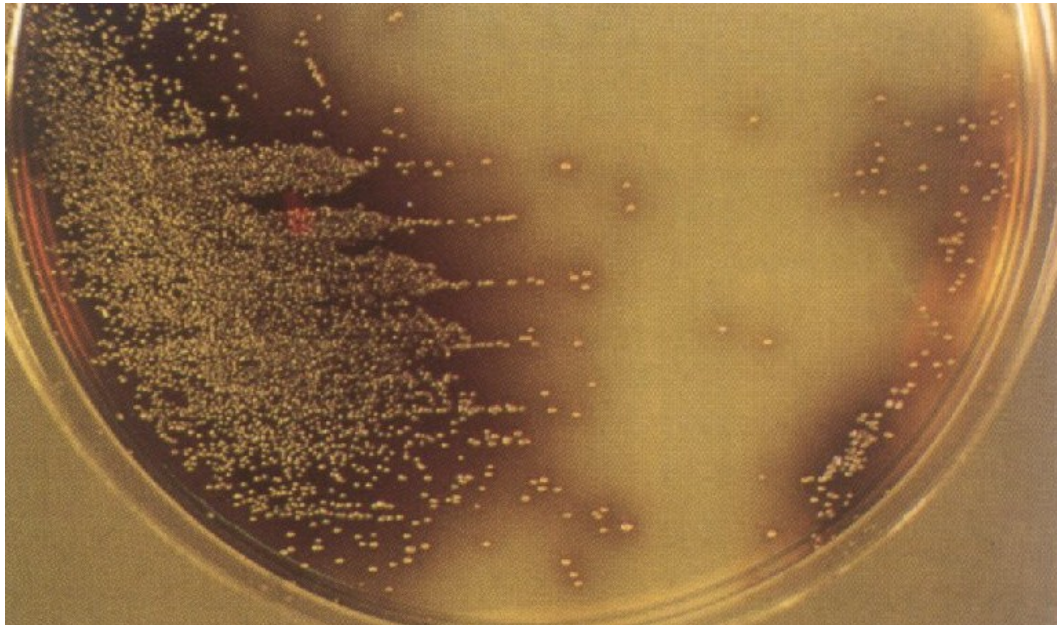
Úkol 2: Kultivace na krevním agaru

- **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+ koků by mohl být stafylokok (bílý, máslovité kolonie)
- Pokuste se odhadnout, která z G+ tyčinek je *Listeria*, *Bacillus* a *Corynebacterium*

Úkol 3: Kataláza, Slanetz Bartley a žluč-eskulin

- **3a:** Proved'te u všech grampozitivních kmenů katalázový test
- **3b:** Zjistěte, které kmeny rostou na Slanetz-Bartelyho půdě s azidem sodným. To by měly být enterokoky.
- **3c:** Na žluč-eskulinovém agaru roste ještě jeden kmen navíc. Ten, který zde roste, a přitom neroste na půdě s azidem sodným, by měl být *Listeria*
- Ověřte si, jestli kmeny určené jako enterokoky se mikroskopicky (Úkol 1) jevíly jako koky a kmen určený jako *Listeria* jako tyčinka.

Žluč-eskulinový agar



Slanetz-Bartley



Úkoly 4: rozlišení enterokoků

- V úkolu 4a sledujte výsledek arabinózového testu (kolonie se smísily s arabinózou a indikátorem, a nechaly inkubovat)

Zelená	negativní	<i>E. faecalis</i>
Žlutá	pozitivní	<i>E. faecium</i>

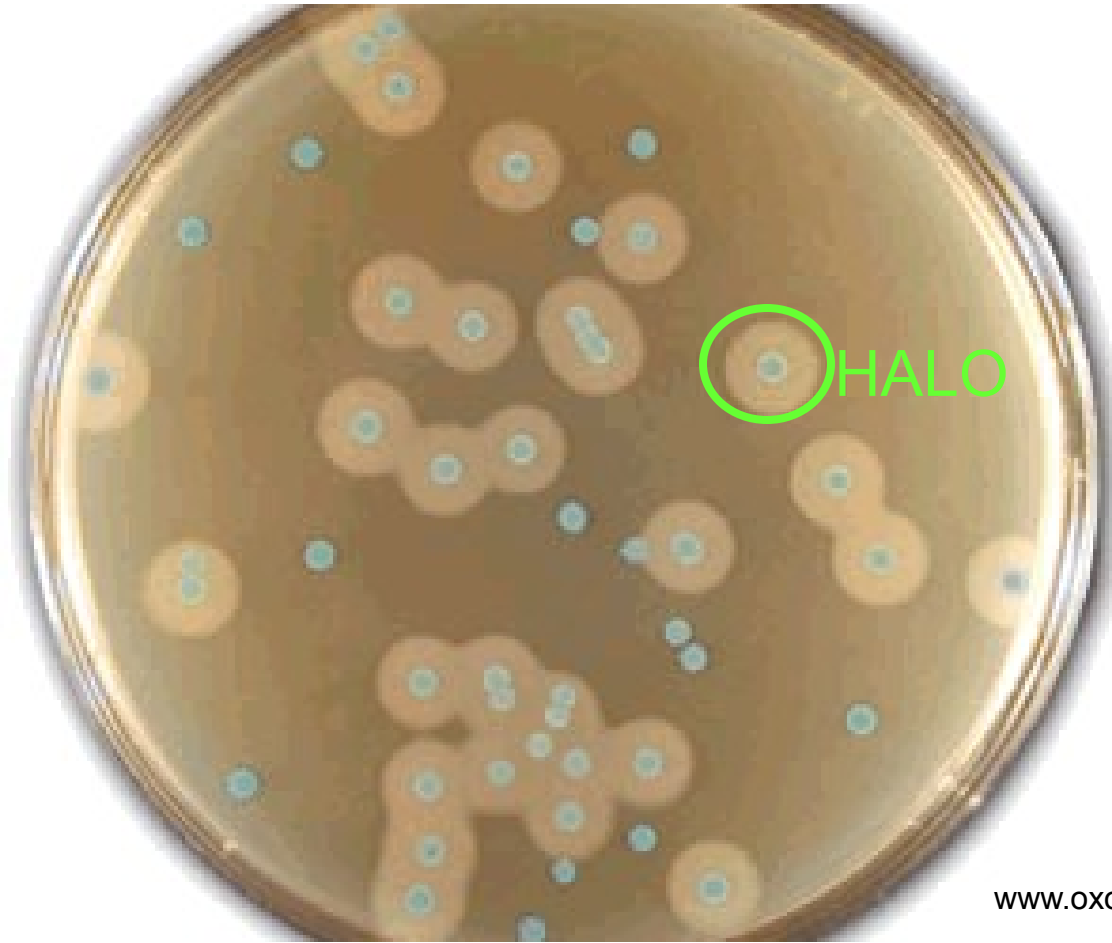
- V úkolu 4b odečtete výsledek EnCoccus testu. Má jen osm reakcí. Určete výsledek pomocí návodů na svých stolech. **% pravděpodobnosti a index typičnosti nevyplňujte, protože nemáte jak je zjistit.**

Úkol 5: Další testy k listeriím

- 5a – Růst při 4 °C – Ze všech námi studovaných G+ tyčinek jen *Listeria* je schopna růst při nízkých teplotách. To jí umožňuje šíření v sýrárnách. Z jiných bakterií (ne G+ tyčinek), roste při chladničkových teplotách několik dalších druhů (*Yersinia*, některé druhy pseudomonád apod.)

5b Chromogenní půda na listerie

ALOA



www.oxid.com

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 6: Odečtěte podle této tabulky

- Všimněte si, které bakterie testujeme na MH a které na MH s krvinkami.

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Ampicilin (aminopenicilin)	AMP	17 mm
Ko-amoxicilin (aminopnc*)	AMC	18 mm
Co-trimoxazol (směs 2)	SXT	16 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	19 mm
Chloramfenikol	C	18 mm
Vankomycin (glykopeptid)	VA	17 mm

*Aminopenicilin potencovaný inhibitorem betalaktamázy

Úkol 7: Elekův test

Jde o detekci toxinu. Používáme papírek se specific. antitoxinem, který je položen na povrch agaru, poté se očkují testované kmeny. Pozitivní výsledek = precipitační linie

