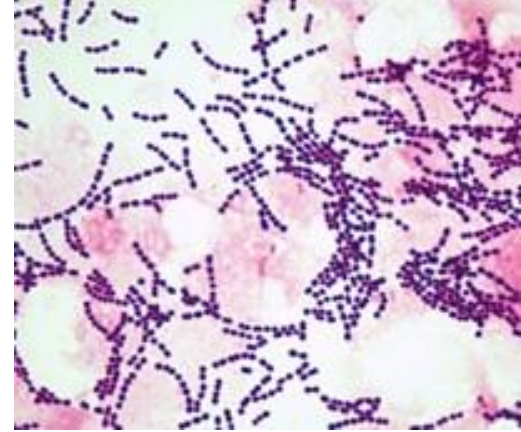


P02

**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

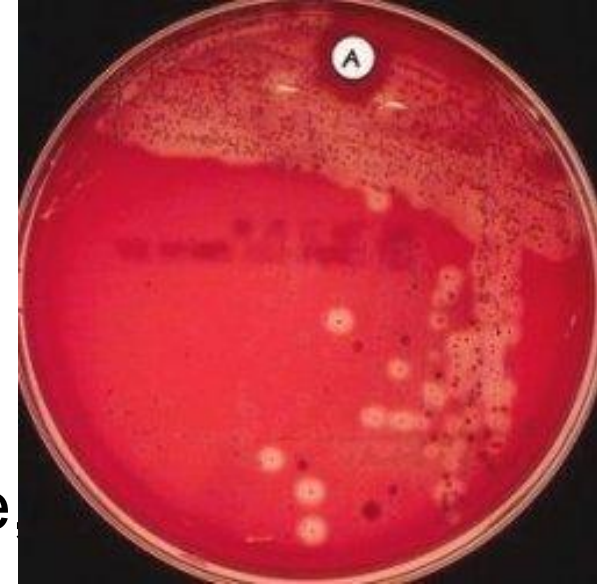


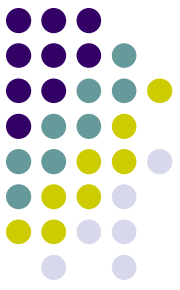
Změny na KA	
viridace (alfa)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	skupina „ústních streptokoků“
(beta) hemolýza*	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	Skupina „non-A-non-B“ streptokoků
žádná	Streptokoky bez hemolýzy („gamáči“)

Streptococcus pyogenes

strepto = v řetízcích, *pyo-genes* = hnisavotvorný
GAS- group A streptococcus

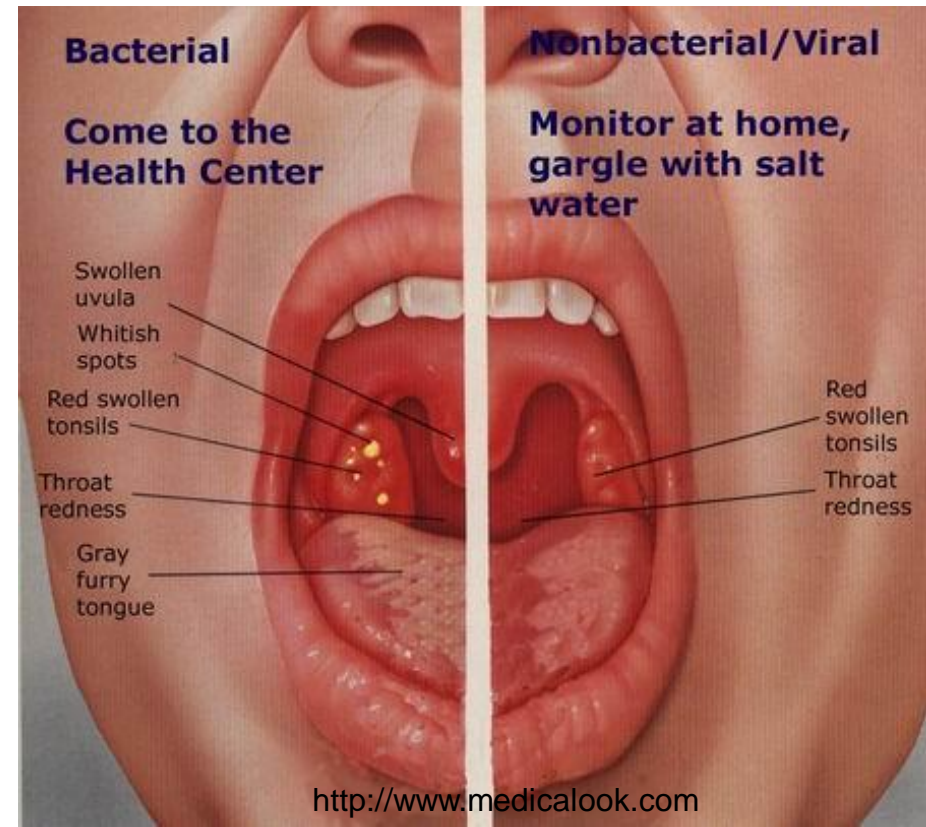
- Úplná beta-hemolýza, drobné kolonie kultivačně náročné
- Původce angíny (akutní tonsilitidy)
- Způsobuje ale také hnisavé záněty tkání. Na rozdíl od abscesů, často způsobených stafylokoky, jde zde spíše o **flegmony**.
- Kromě angin má také na svědomí spály a erysipel – růži. Jde o kmeny produkující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





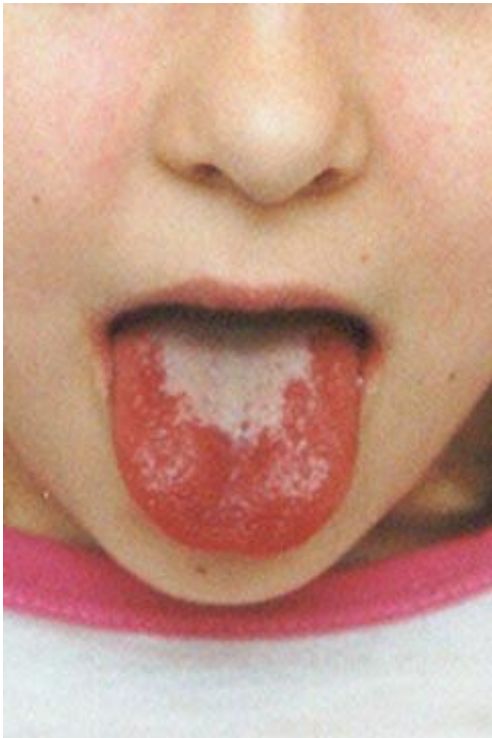
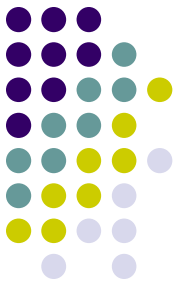
Tonsilitis („angína“)

- 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
Faryngitida nebo pouze kožní projevy



Růže (erysipiel)

Ostře ohraničený zánět
Na bérkách, v obličejí
Často recidivy



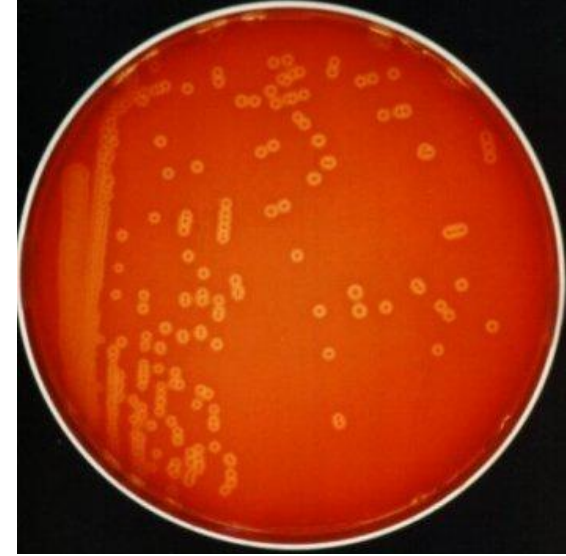
Kožní hnisavé infekce

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 žen v urogenitálním tr. a GIT
- Infekce novorozenců (časně a pozdní)- sepse, pneumonie, meningitidy
- Inf. gravidních žen

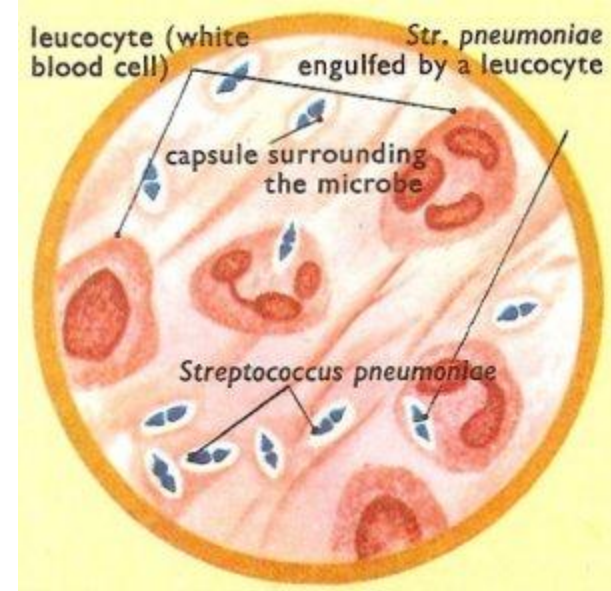
„non-A-non-B“ streptokok

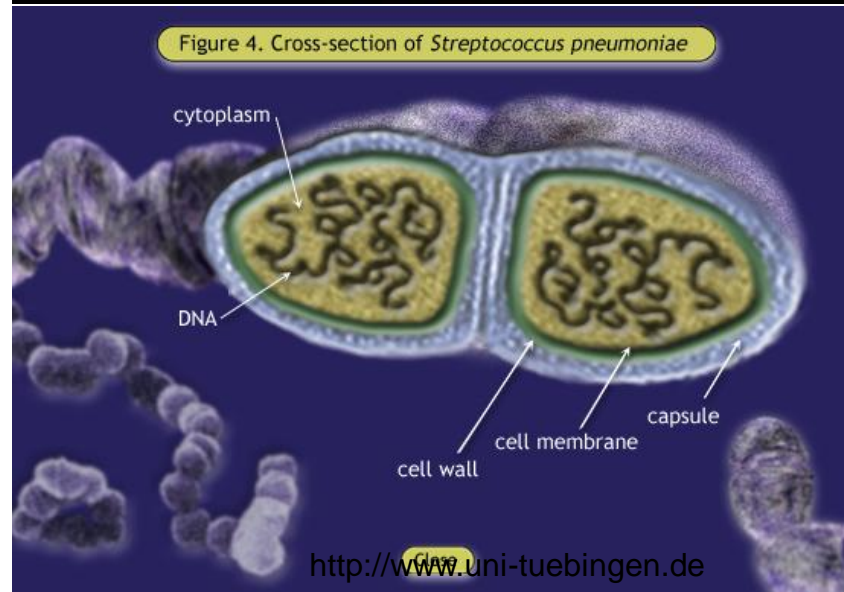
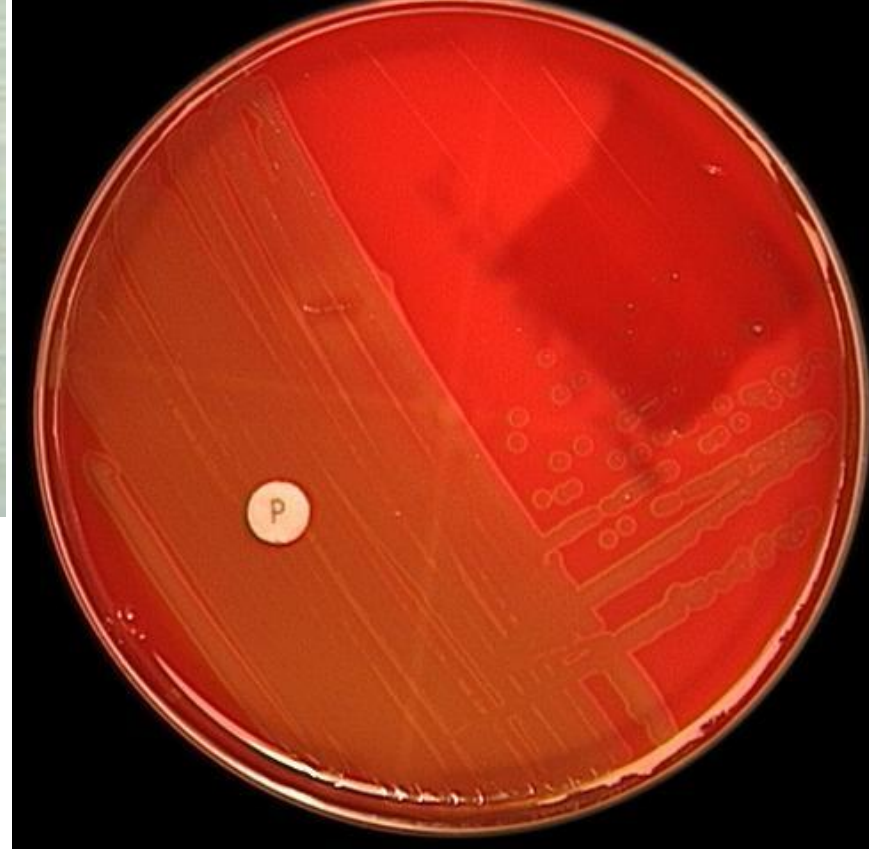
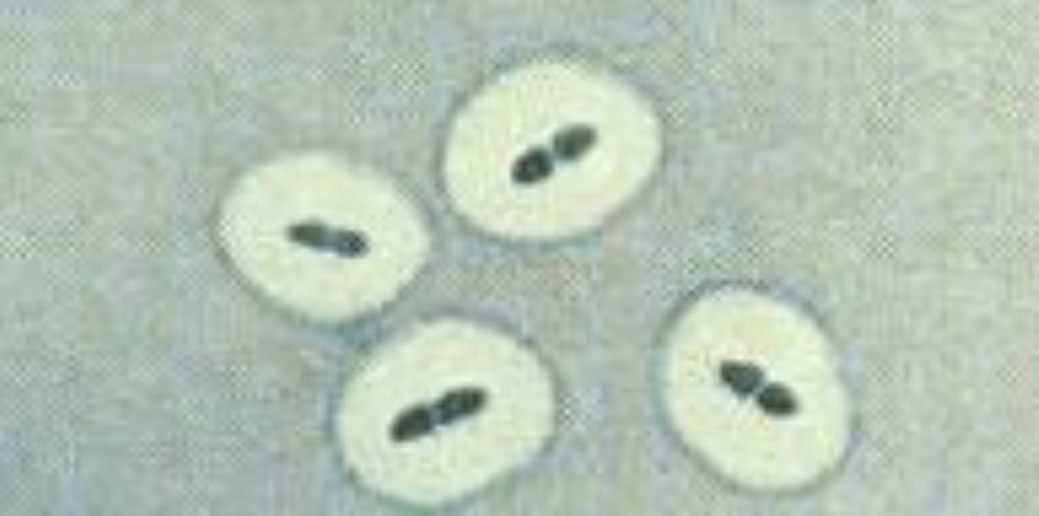


- Říkáme jim tak proto, že nepatří ani do skupiny A (ve které je *Streptococcus pyogenes*) ani do skupiny B (kde je *S. agalactiae* a některé zvířecí streptokoky).
- Nezpůsobují tak často angíny, ale spíše **faryngitidy – záněty hltanu**. Často však mohou být přítomny v krku bez klinických potíží.
- *S. dysgalactiae*, *S. equi*

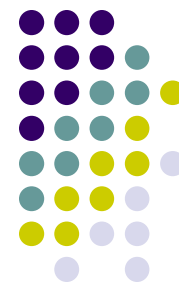
Streptococcus pneumoniae

- 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

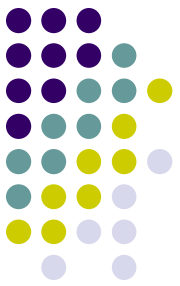




- V malém množství se nachází i ve farynzích zdravých osob.
- Sinusitidy
- Pneumonie
- Záněty středouší
- Meningitidy
- Sepse
- Endokarditidy
- Očkování



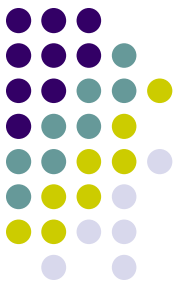
Viridující streptokoky



- **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)

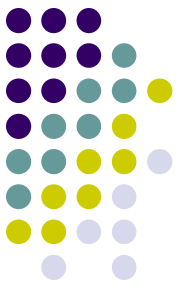
Viridující streptokoky





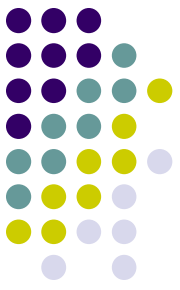
Léčba

- 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)

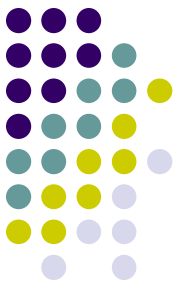


Diagnostika streptokoků

- **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.



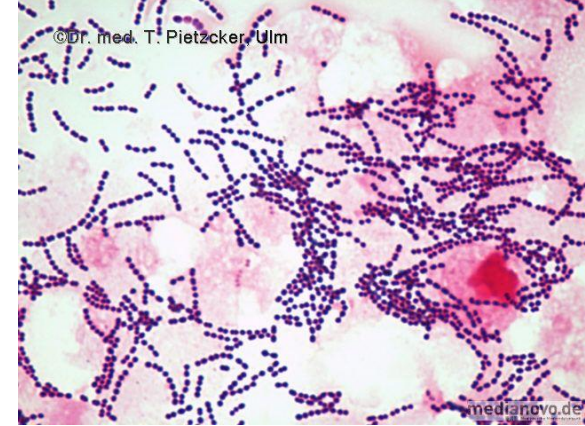
- **Biochemické testy:** kataláza i oxidáza negativní, biochemicky lze rozlišit jednotlivé druhy zejména u viridujících.
- **Antigenní analýza** může naopak pomoci spíše u hemolyzujících streptokoků. Používá se **system dle Lancefieldové** – teoreticky zahrnuje všechny streptokoky, ale mnohé viridující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



Diferenciální diagnostika

- 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
- *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

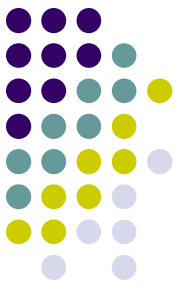
S. pyogenes

S. agalactiae (SAG)

Ústní streptokok

Streptokok non-A-non-B

Úkol 1: barvení kultur podle Grama



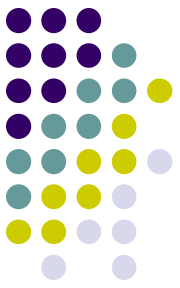
- Obarvěte podle Grama osm kmenů (pro zopakování: natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem, poté barvit: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní obj.)
- Jeden kmen vyloučíte snadno: bude to G- tyčinka. Další tři budou G+ koky a spolehlivě je tedy mikroskopii nedokážete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

Úkol 2



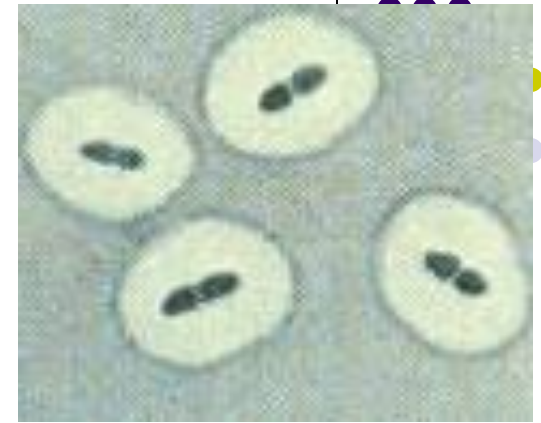
- V úkolu 2a odhalíme stafylokoka **katalázovým testem** (kolonie vmícháme do kapky peroxidu vodíku). Pokud šumí, je to stafylokok
- V úkolu 2b odhalíme enterokoka tím, že roste na **Slanetz-Bartleyho půdě**. Dříve se používala půda **žluč eskulinová**. Obě půdy jsou prakticky rovnocenné.

Úkol 3: Popis kolonií streptokoků na KA



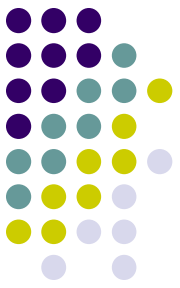
- Pečlivě si prohlédněte a popište zbylé kmeny streptokoků.
- *Prohlédněte si i ostatní kmeny, všimněte si, jak moc se jejich kolonie liší od streptokoků. Popisovat je však nemusíte.*
- Popište všechny vlastnosti kolonií a zvláště si všimněte těch vlastností, které odlišují streptokoky od ostatních gram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

Pneumokok

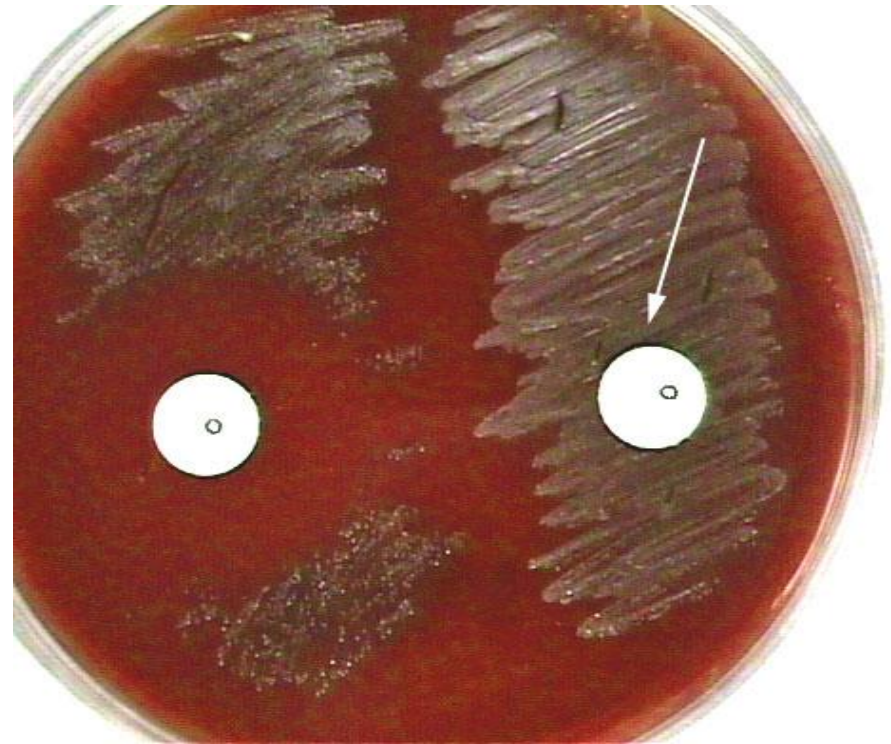


- Pneumokoka **odlišíte** optochinovým testem – viz další obrazovka.
- **Podezření** však můžete pojmout, když:
 - mikroskopicky vidíte **lancetovité diplokoky**
 - kultivačně jsou kolonie **ploché, penízkovité až miskovité**, někdy s centrálním vyvýšením
 - někdy naopak jsou kolonie výrazné, **hlenovité** 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



Úkol 4b: Druhové určení ústního streptokoka

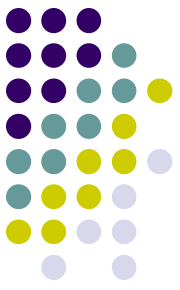


- Jen blázen (nebo badatel, což je někdy totéž😊) by druhově určoval ústního streptokoka z ústní dutiny nebo krku. Proč to činit, když je v těchto místech běžnou flórou?
- Na druhou stranu, máme-li kmen z hemokultury či likvoru, je jeho určení na místě. U viridujících streptokoků nemá smysl snažit se 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

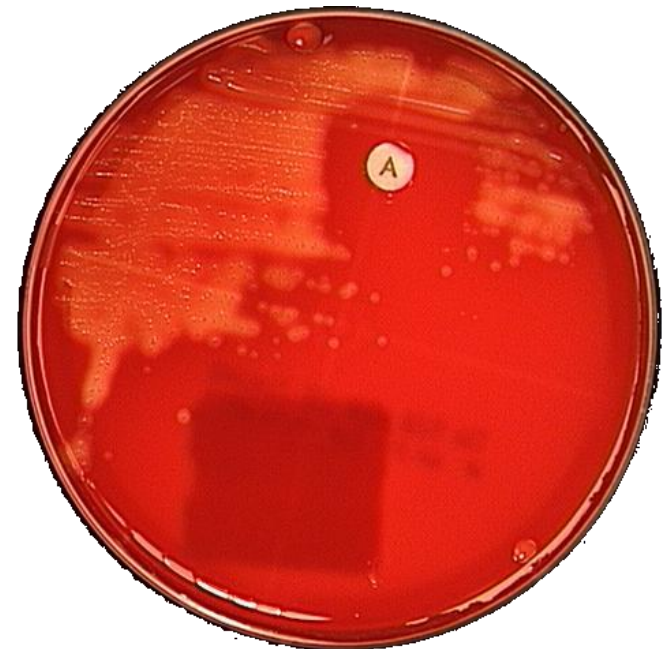


- První reakcí je opět VPT
- Druhou až devátou reakcí je opět první řádek v dvojřádku
- Obdobně desátou až sedmnáctou reakcí je druhý řádek v dvojřádku



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.



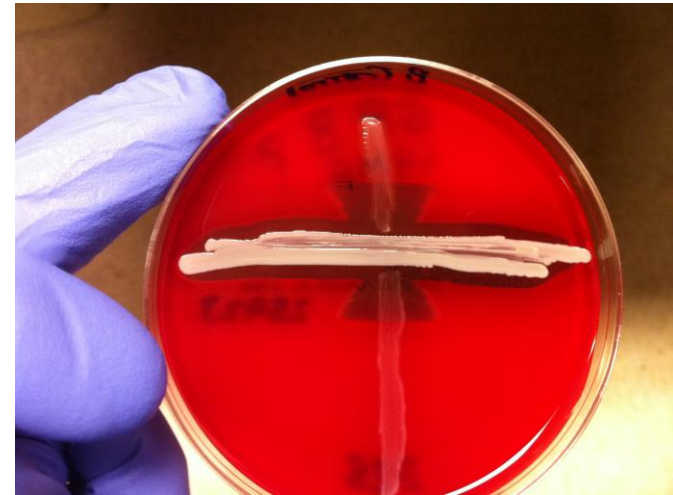
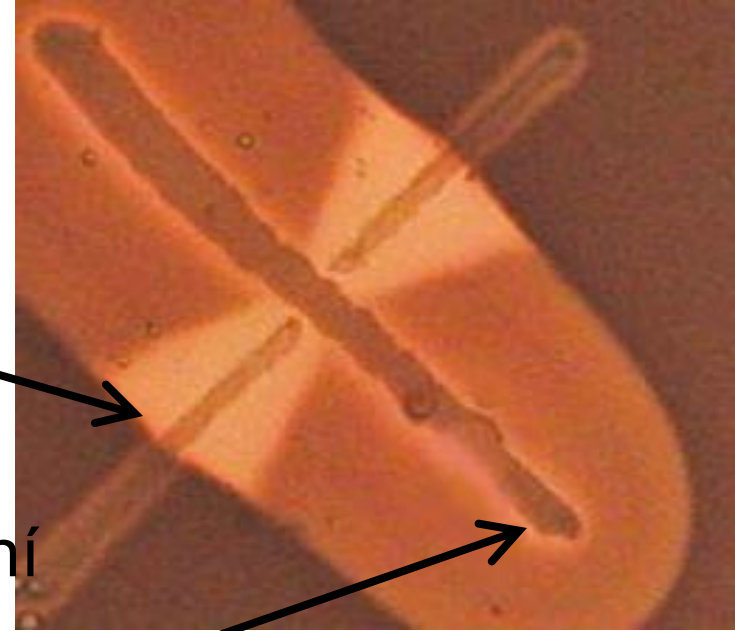
Streptococcus agalactiae- CAMP test



- 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



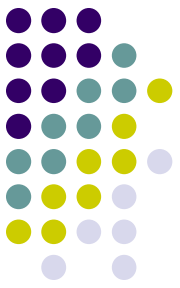
Shrnutí



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	nesmysl, špatný test, případně směs dvou kmenů

*v případě potřeby se blíže identifikuje průkazem antigenu

Úkol 5c- Latexová aglutinace

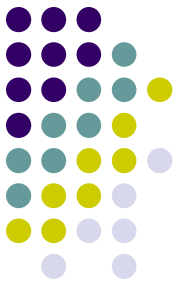


Praktický test: lahvičky se směsí antibiotik a latexových částic

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



Zapamatujte si:



Streptokoky s

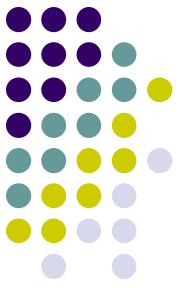
hemolýzou (úplnou nebo částečnou), ale také streptokoky zcela bez hemolýzy mohou být zpravidla určovány **latexovou aglutinací** (je-li to zapotřebí). Jejich biochemická aktivita je zpravidla chabá.



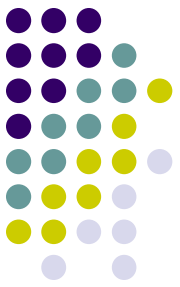
Streptokoky s viridací

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

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.

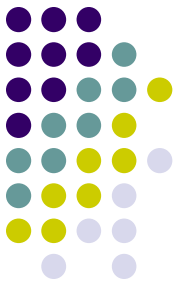


Test citlivosti na streptokoky

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

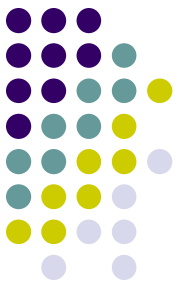
Klindamycin se běžně testuje, vy ho však ve své sestavě nemáte!

Pozdní následky streptokokových infekcí



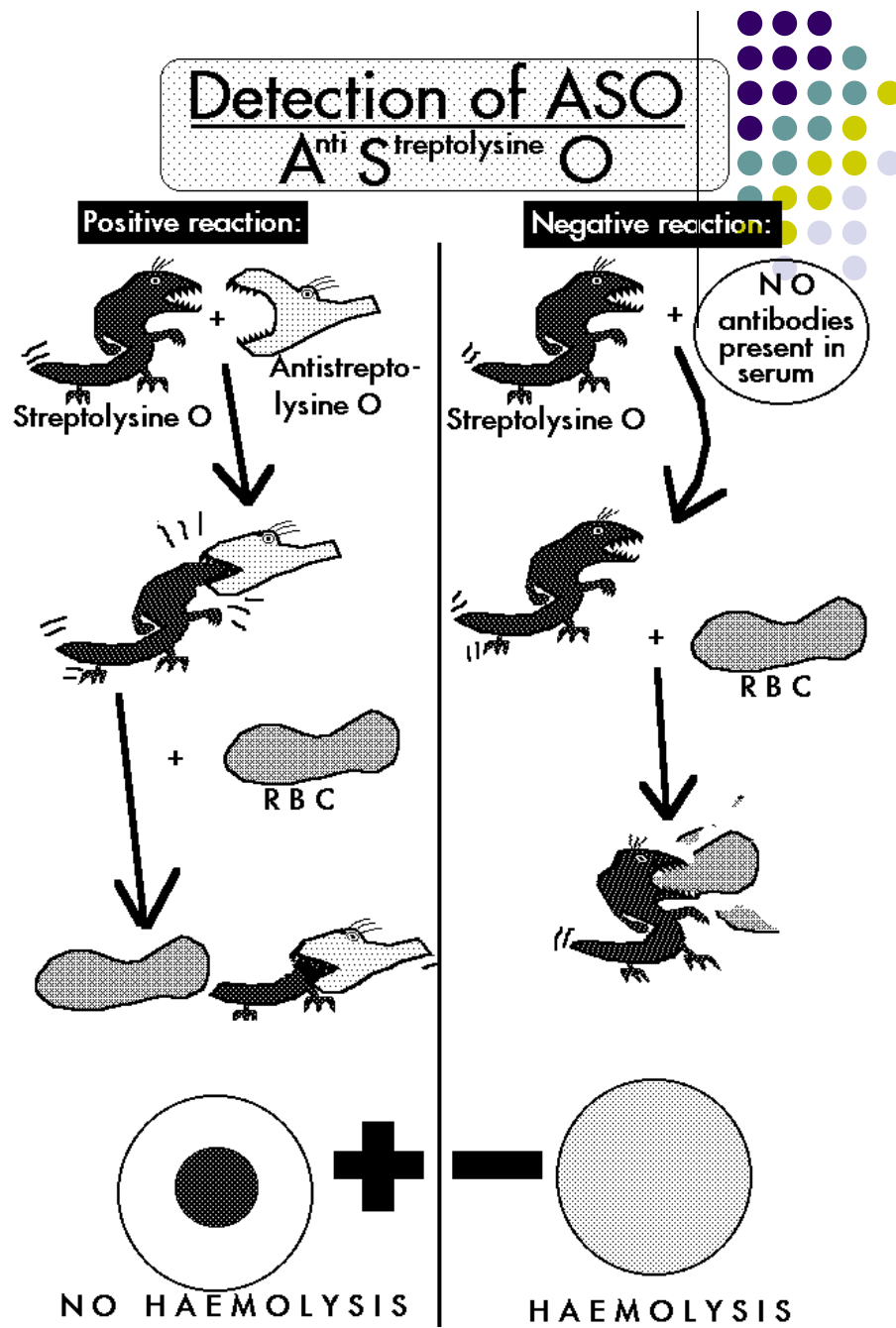
- Po každé streptokokové infekci se objevují protilátky, včetně protilátek proti streptokokovému toxinu-**streptolyzinu O**
- Někdy se stane, že množství těchto protilátek po infekci neklesá, ale naopak stoupá, omylem se místo na streptokoky **vážou na některé struktury organismu.**
- V takovém případě 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.

Princip vyšetření ASLO: neutralizace hemolýzy



ASLO- princip



- **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

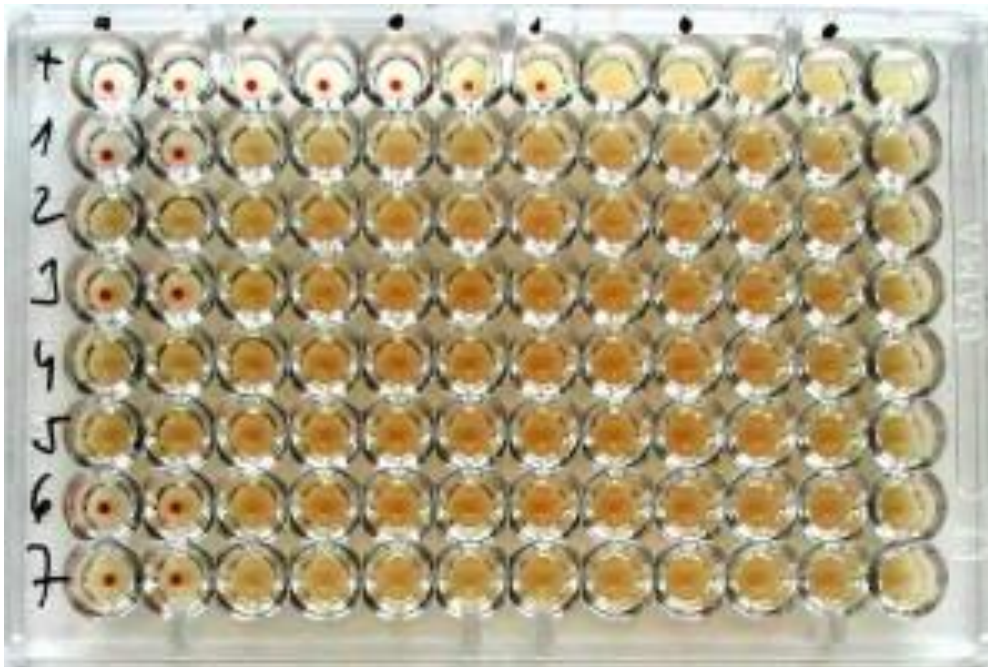
Hodnocení výsledků ASLO

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

Úkol 7: Odečtěte panel ASLO



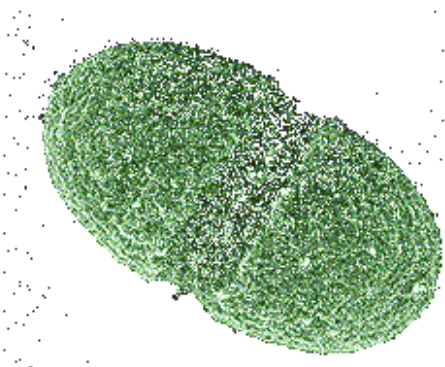
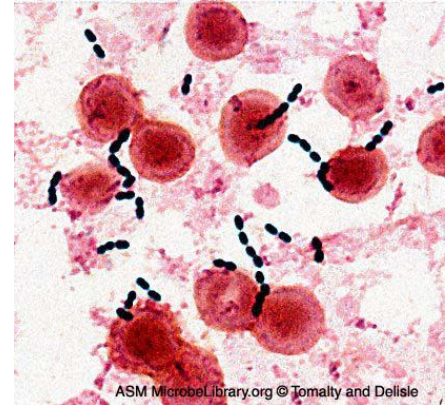
- Pozor! Každý pacient jen jeden řádek, hodnoty ředění jsou uvedeny na lístečcích, které máte na stole



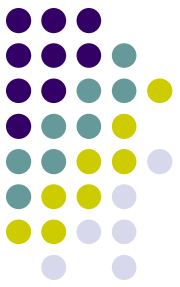
- Panel se odečítá naležato. Obsahuje pozitivní kontrolu a 7 pacientů.

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

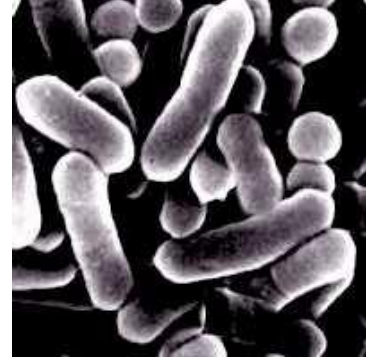


Enterokoky – vzhled kolonií



Rod *Listeria*

- G+ krátké tyčinky vyskytující se v prostředí a potravinách (mléko, sýry, zelenina, maso, 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.



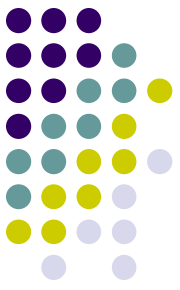
Listerióza (*L. monocytogenes*)

- zřídka vyvolává viditelné infekce dospělých (gastroenteritida, horečnaté onemocnění)
- je však nebezpečná pro těhotné a novorozence (bakteriémie, meningitida, pneumonie),
a pro oslabené osoby (infekce ran, sepse, meningitidy)



Listeria

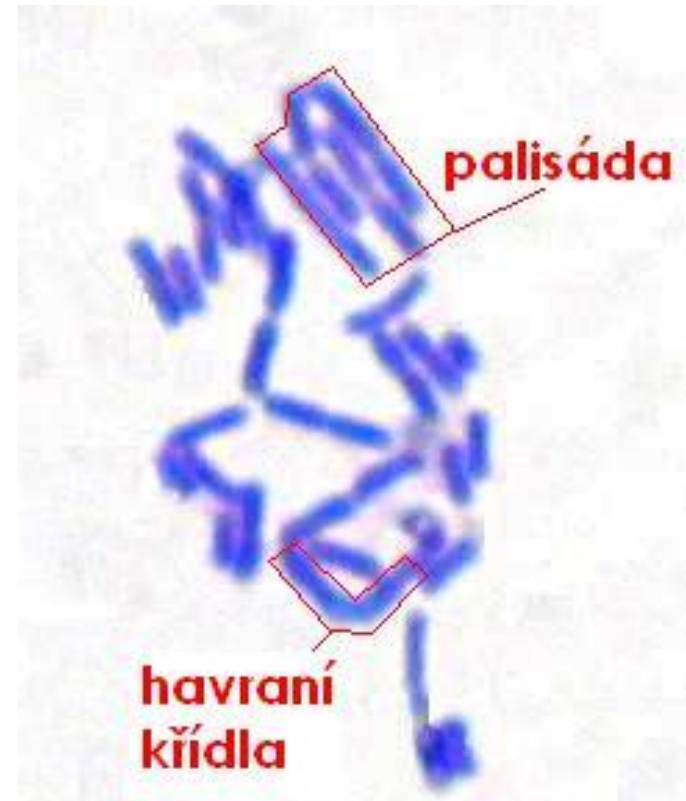
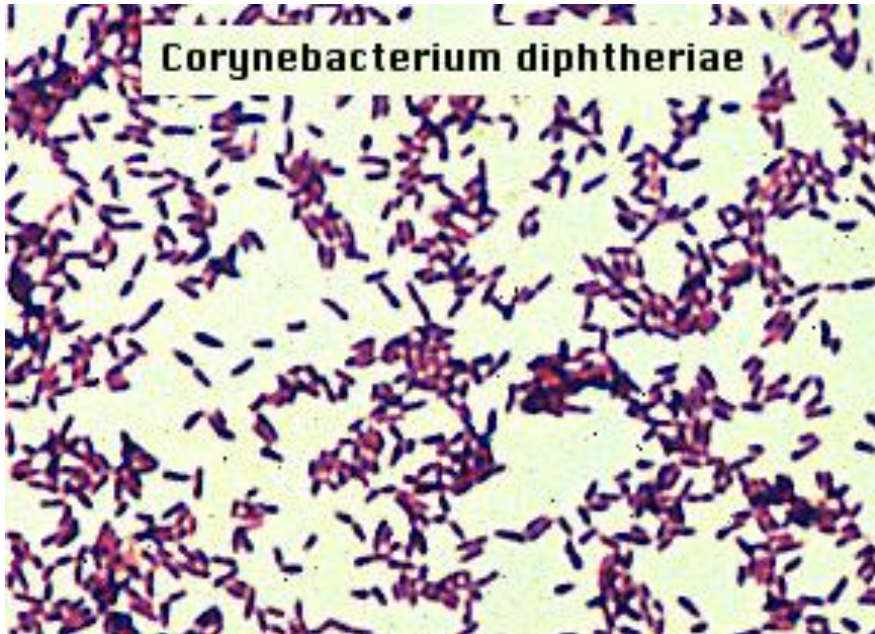
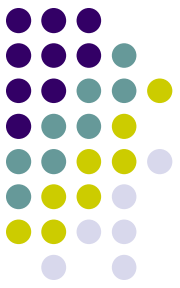




Korynebacteria

- 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** (= nezáškrťových) – jsou normální součástí běžné flóry na kůži, spolu se stafylokoky a kvasinkami

Korynebakteria- tvary



Záškrť



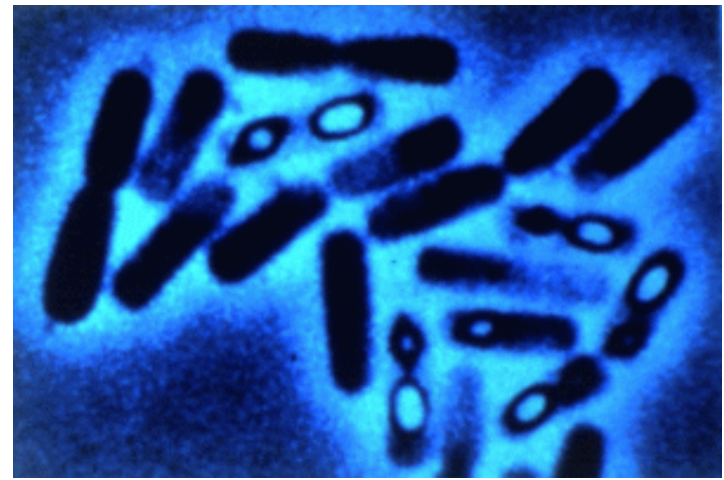
Pseudomembranózní angína (pablány, otok)
Záškrť vzniká pouze pokud kmen produkuje
difterický toxin (ten do buňky vnaší tzv. β -fág)



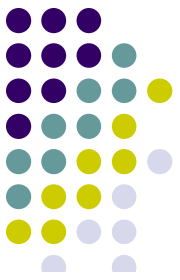
Rod *Bacillus*

- G+ mohutné tyčinky s rovnými konci
- Tvoří jednu endosporu, pohyblivé
- Kataláza +

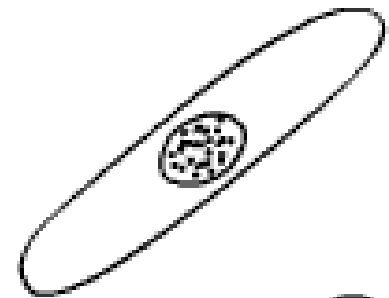
- Většina příslušníků rodu *Bacillus* jsou neškodné mikroby, jejich spóry se vyskytují ve vnějším prostředí. Pokud se vyskytnou v kultivaci klinického vzorku, jde pravděpodobně o kontaminaci



Jsou však i bacily stojící za zmínku



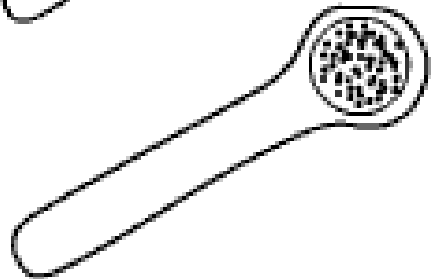
- *Bacillus anthracis* se stal populárním při teroristických hrozbách. Obligátní patogen, původce veterinárního onemocnění – **antraxu** – byl jednou z prvních nálezů, proti nimž byla zkoušena (Pasteurem) vakcinace.
- *Bacillus cereus* je původcem enterotoxikóz a infekcí oka. U imunokompromitovaných 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

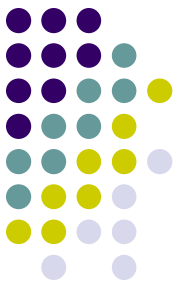


ex : *B. Polyxyma* (fixe le N₂)



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

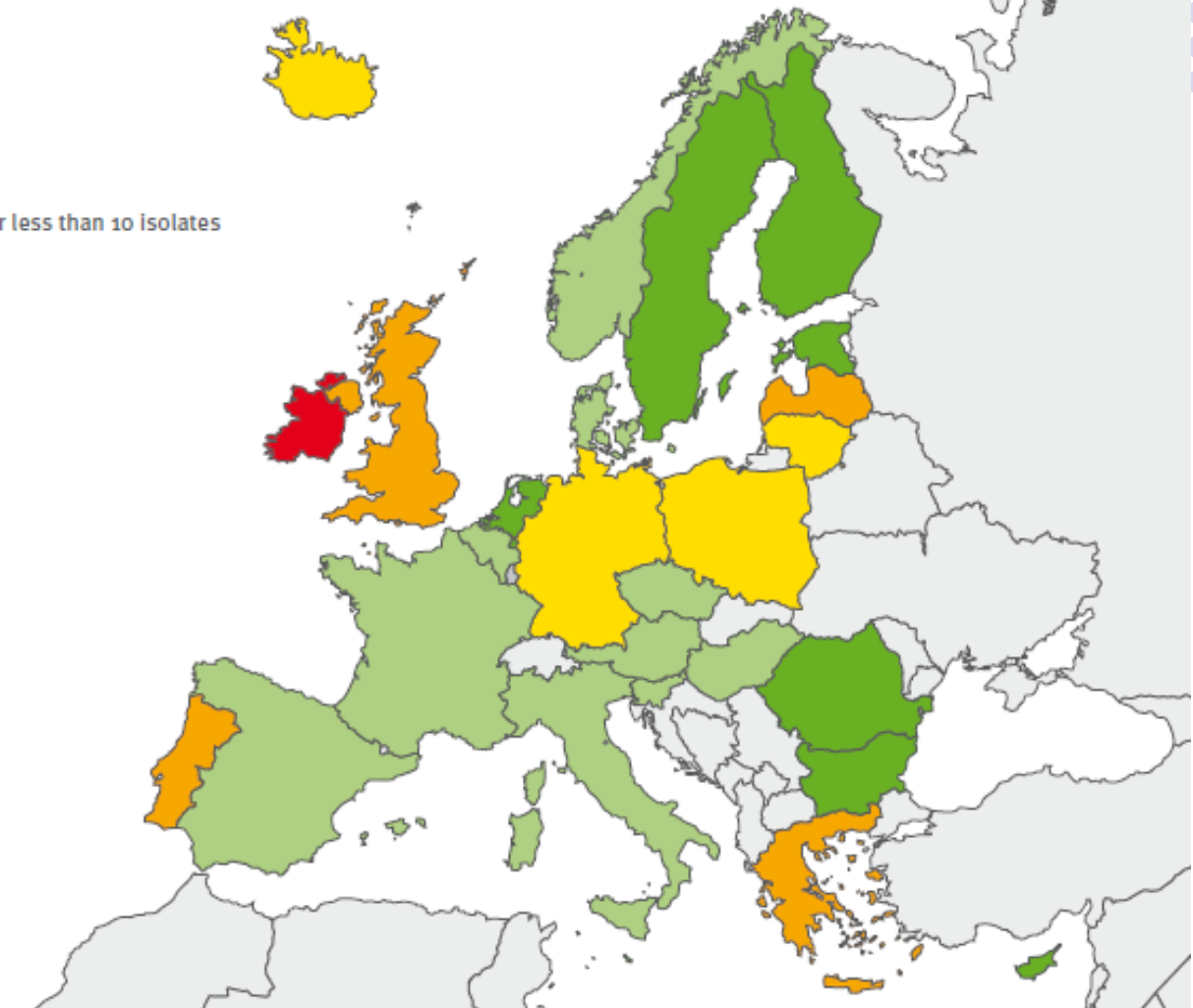



Table 5.4: Number of invasive *E. faecalis* and *E. faecium* isolates and proportion of high-level aminoglycoside-r

Diagnostika



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



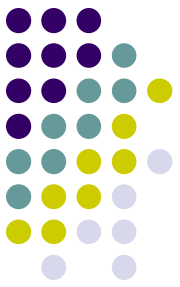
- Biochemické testy: kataláza negativní, možné je biochemické rozlišení, důležité štěpení arabinosy (*E. faecalis* neštěpí, půda je zelená, *E. faecium* štěpí, žlutne)
- Antigenní analýza se zpravidla nepoužívá. V
- Citlivost lze testovat na běžném MH agaru. Existují i půdy na screening VRE

Diagnostika-G+ tyčinky

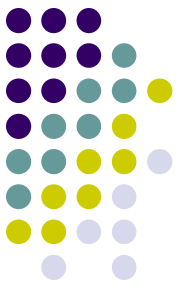


- Biochemické testy: kataláza u všech tří pozitivní. Biochemicky lze rozlišovat koryneformní tyčinky navzájem (API Coryne, Remel)
- Růst při nízkých teplotách a vysokých koncentracích NaCl se používají v diagnostice listerií
- Průkaz antigenu – například průkaz difterického toxinu Elekovým testem

Úkol 1: Barvení kultur podle Grama



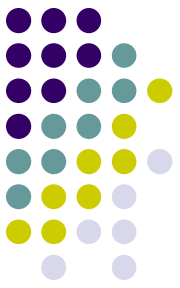
- Obarvěte podle Grama osm podezřelých kmenů (pro zopakování: natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem, poté barvit: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní obj.)
- Rozlišíte bakterie podle tvaru a typu buněčné stěny. Pro vzájemné rozlišení G+ koků a vzájemné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



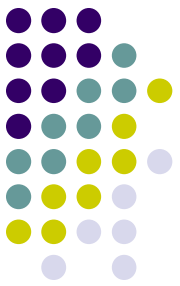
- **3a:** Proved'te u všech grampozitivních kmenů katalázový test
- **3b:** Zjistěte, které kmeny rostou na Slanetz-Bartelyho půdě s azidem sodným. To by měly být enterokoky.
- **3c:** Na žluč-eskulinovém agaru roste ještě jeden kmen navíc. Ten, který zde roste, a přitom neroste na půdě s azidem sodným, by měl být *Listeria*

Žluč-eskulinový agar



Slanetz-Bartley





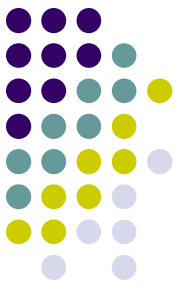
Úkoly 4: rozlišení enterokoků

- 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>

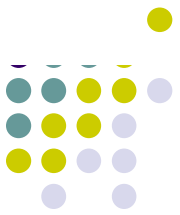
- V úkolu 4b odečtěte výsledek EnCoccus testu. Má jen osm reakcí. Určete výsledek pomocí návodů na svých stolech. **% pravděpodobnosti a index typičnosti nevyplňujte, protože nemáte jak je zjistit.**

Úkol 5: Další testy k listeriím

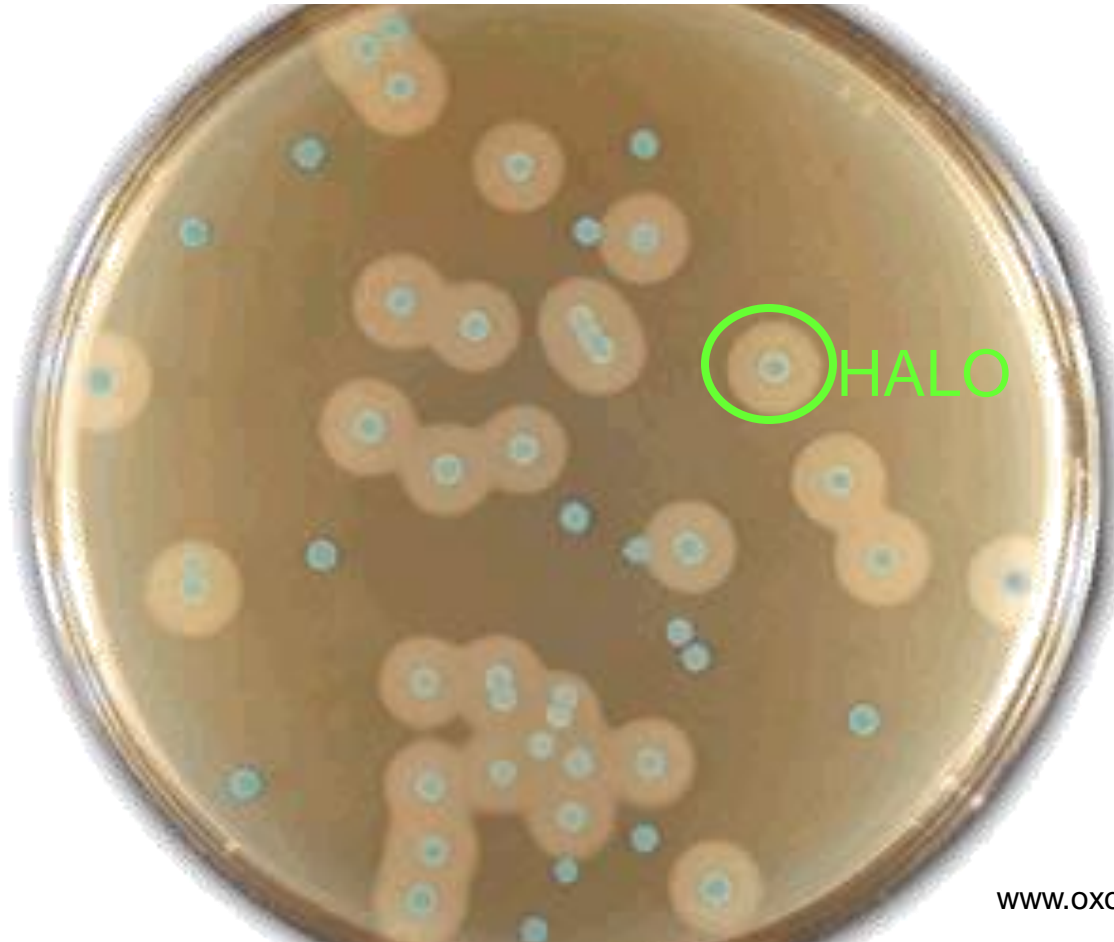


- 5a – Růst při 4 °C – Ze všech námi studovaných G+ tyčinek jen *Listeria* je schopna růst při nízkých teplotách. To jí umožňuje šíření v sýrárnách. Z jiných bakterií (ne G+ tyčinek), roste při chladničkových teplotách několik dalších druhů (*Yersinia*, některé druhy pseudomonád apod.)

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 inhibítozem betalaktamázy