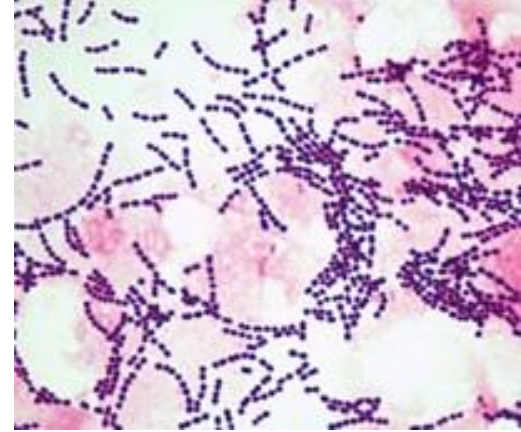


P02

**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



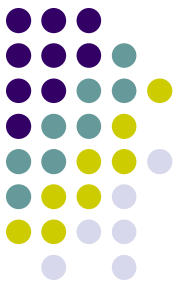
Změny na KA	
viridace (alfa)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	skupina „ústních streptokoků“
(beta) hemolýza	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	Skupina „non-A-non-B“ streptokoků
žádná	Streptokoky bez hemolýzy

Streptococcus pyogenes

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

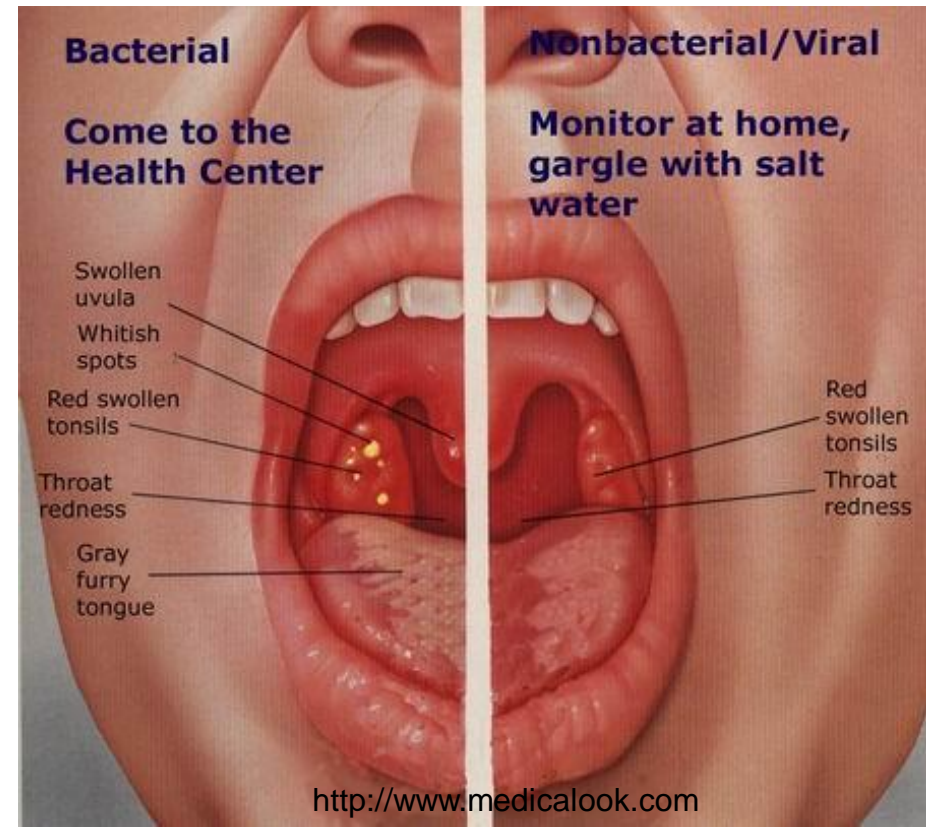


- Úplná beta-hemolýza, drobné kolonie
- Původce angíny (akutní tonsilitidy)
- Kromě angin má také na svědomí spály a erysipel – růži. Jde o kmeny produkující tzv. erythrogenní toxin (erythros = řecky červený)
- Způsobuje ale také hnisavé záněty tkání. Na rozdíl od abscesů, často způsobených stafylokoky,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



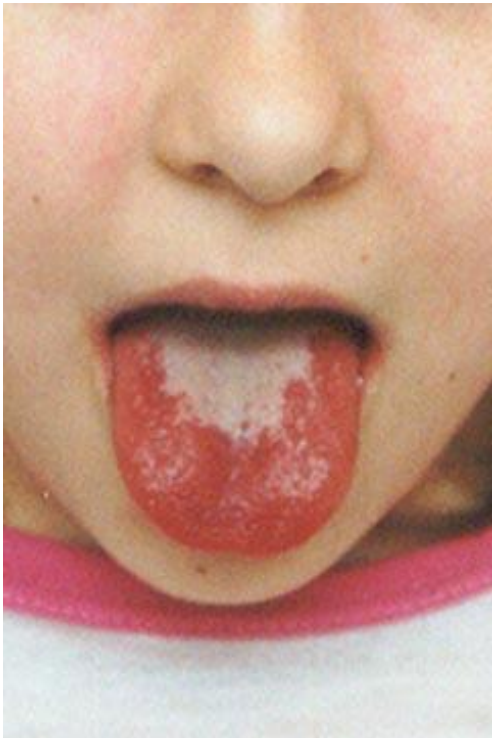
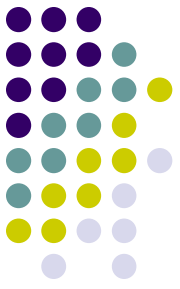
Tonsilitis („angína“)

- 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 (nekrotizující fasciitis)

Pneumonie, meningitidy

Sepse

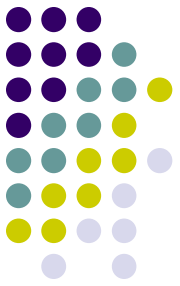
Streptococcus agalactiae



GBS- group B streptococci

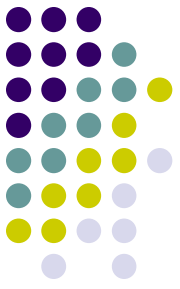
- Větší kolonie, neúplná beta-hemolýza
- Tato bakterie způsobuje záněty mléčné žlázy s poruchou tvorby mléka, avšak většinou je to u krav.
- U žen v urogenitálním traktu a GIT, původce močových infekcí
- Infekce novorozenců (časné a pozdní)- sepse, pneumonie, meningitidy
- Infekce gravidních žen

„non-A-non-B“ streptokok

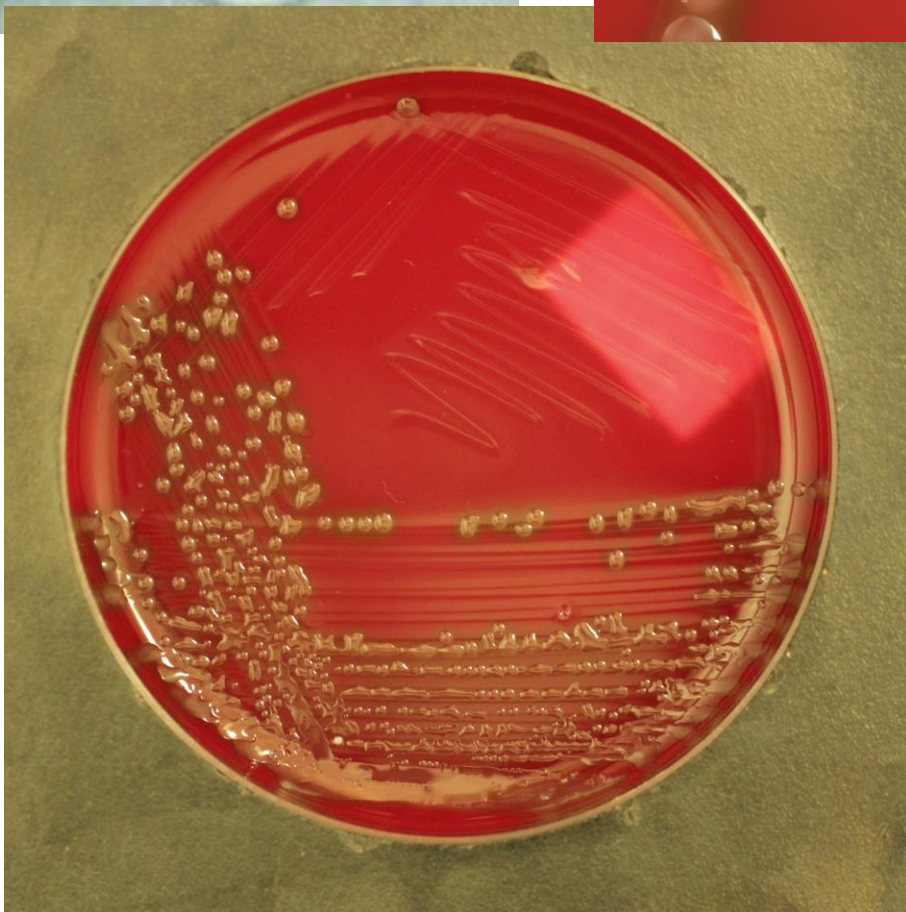


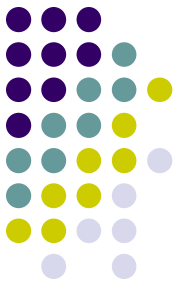
- Říkáme jim tak proto, že nepatří ani do skupiny A (ve které je *Streptococcus pyogenes*) ani do skupiny B (kde je *S. agalactiae*).
- Nezpůsobují tak často angíny, ale spíše faryngitidy – záněty hltanu. Často však mohou být přítomny v krku bez klinických potíží.
- *S. dysgalactiae*, *S. equi*

Streptococcus pneumoniae



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

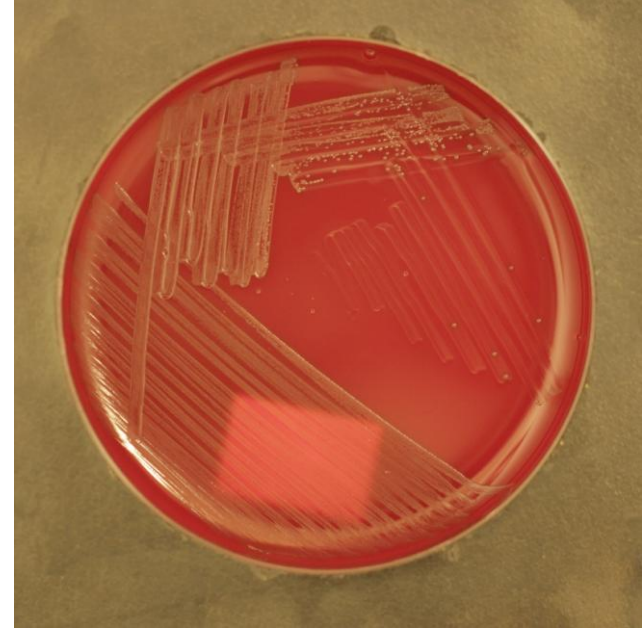




- V malém množství se nachází i ve farynzích zdravých osob.
- Sinusitidy
- Pneumonie
- Záněty středouší
- Meningitidy
- Sepse
- Endokarditidy
- Očkování

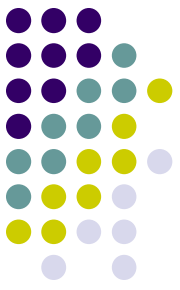
Viridující streptokoky

- Neboli **ústní streptokoky, alfa streptokoky**
- Skupina 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)



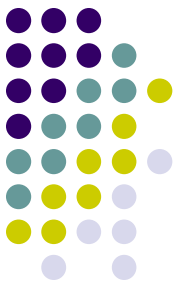
Viridující streptokoky





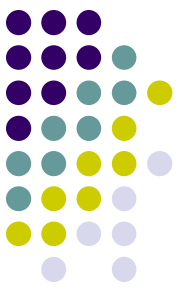
Léčba

- 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

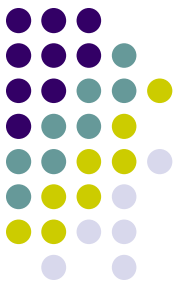


Diagnostika streptokoků

- **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.



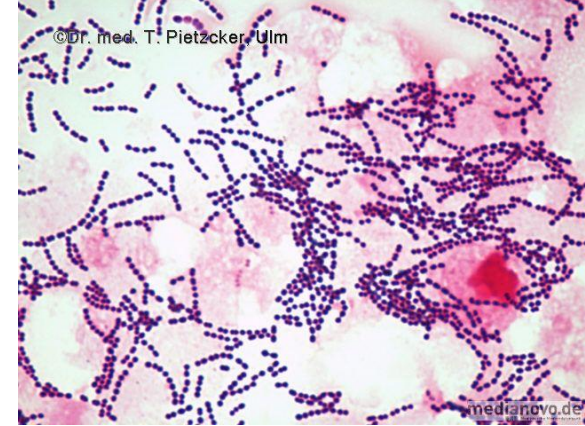
- **Biochemické testy:** kataláza i oxidáza negativní, biochemicky lze rozlišit jednotlivé druhy zejména u viridujících.
- **Antigenní analýza** může naopak pomoci spíše u hemolyzujících streptokoků. Používá se **system dle Lancefieldové** – teoreticky zahrnuje všechny streptokoky, ale mnohé viridující 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:



G+ kok

Streptokok

Stafylokok

Enterokok

Streptokok s viridací

Streptokok s hemolýzou

Streptokok bez hemolýzy

Pneumokok

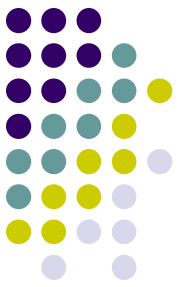
S. pyogenes

S. agalactiae (SAG)

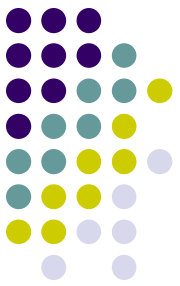
Ústní streptokok

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

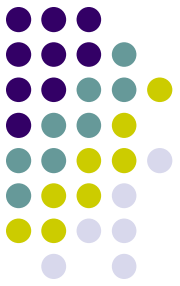
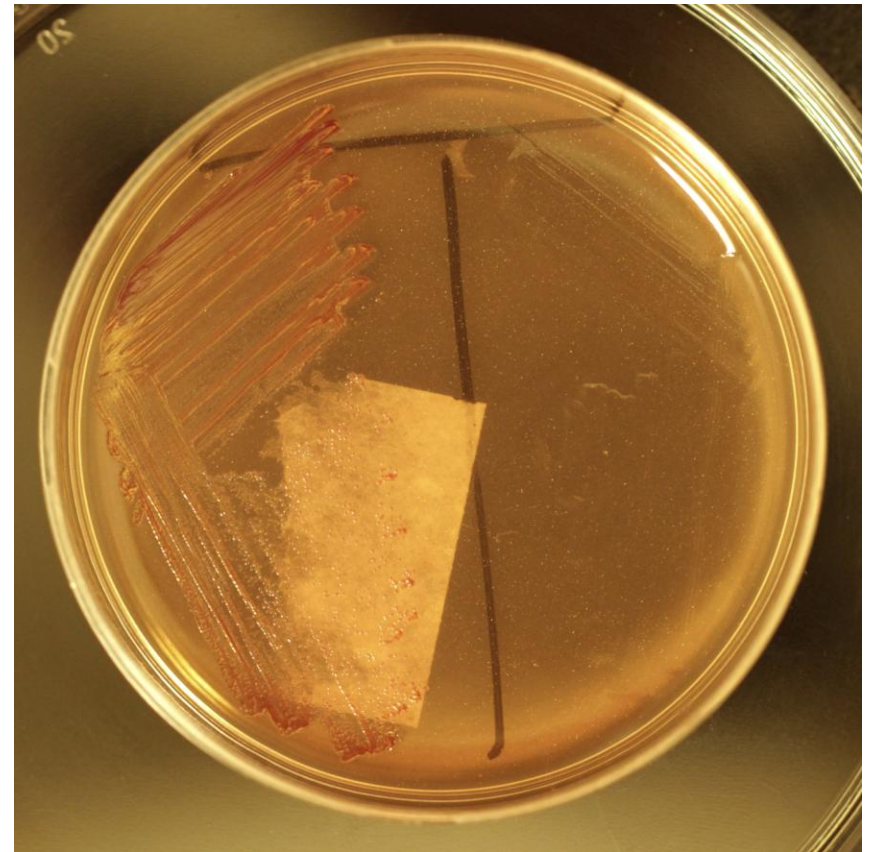


Úkol 2a

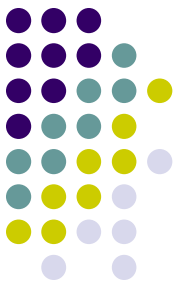
- V úkolu **2a** odhalíme stafylokoka **katalázovým testem** (kolonie vmícháme do kapky peroxidu vodíku). Pokud šumí, je to stafylokok.

Úkol 2b

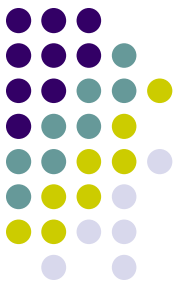
- V úkolu **2b** odhalíme enterokoka tím, že roste na **Slanetz-Bartleyho půdě**. Dříve se používala půda **žluč eskulinová**. Obě půdy jsou prakticky rovnocenné.



Úkol 3: Popis kolonií streptokoků na KA



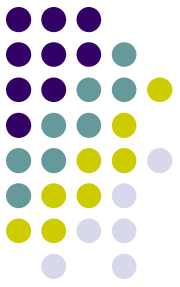
- Pečlivě si prohlédněte a popište zbylé kmeny streptokoků.
- *Prohlédněte si i ostatní kmeny, všimněte si, jak moc se jejich kolonie liší od streptokoků. Popisovat je však nemusíte.*
- Popište všechny vlastnosti kolonií a zvláště si všimněte těch vlastností, které odlišují streptokoky od ostatních gram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



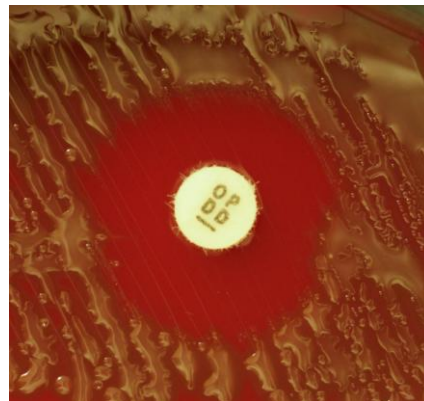
Pneumokok

- 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)

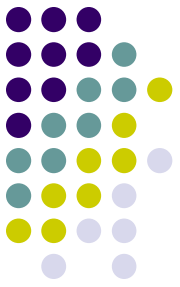
Úkol 4a: Optochinový test



- 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

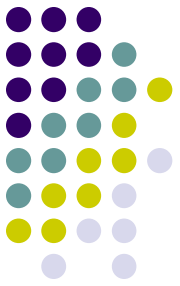


Úkol 4b: Druhové určení ústního streptokoka

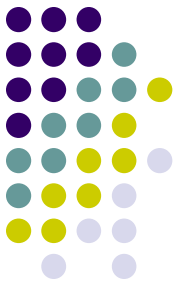


- Proč dourčovat ústní streptokoky, když je v těchto místech běžnou flórou?
- Na druhou stranu, máme-li kmen z hemokultury či likvoru, je jeho určení na místě. U viridujících streptokoků nemá smysl snažit se o antigenní analýzu, zato, jak jsme se již dozvěděli, velice dobře lze použít biochemické určení.
- V našich podmínkách je to **STREPTOtest 16**

STREPTOtest 16 – jak odečíst

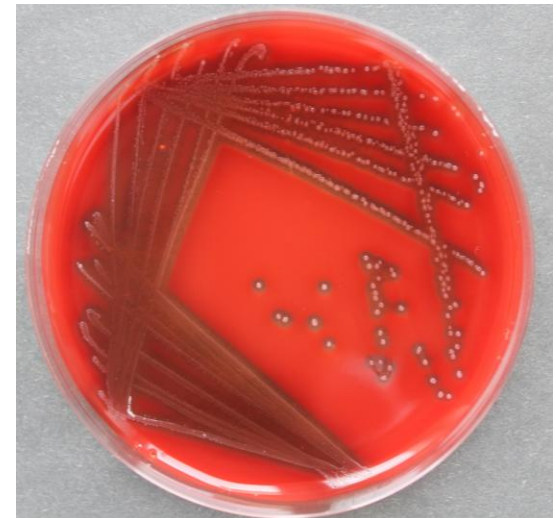


- První reakcí je opět VPT
- Druhou až devátou reakcí je opět první řádek v dvojřádku
- Obdobně desátou až sedmnáctou reakcí je druhý řádek v dvojřádku

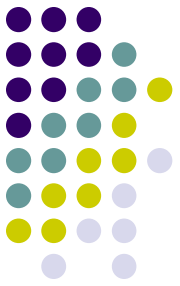


Úkol 5a PYR test

- **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.

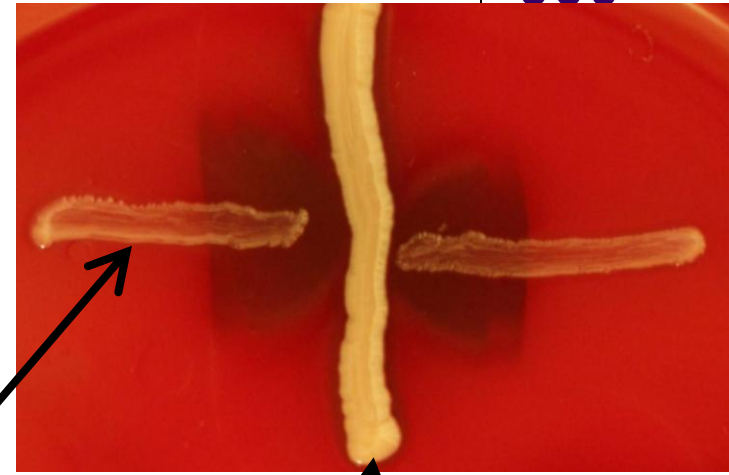


Streptococcus agalactiae- CAMP test



- Pokud na agar působí dva hemolyziny, může být jejich působení **synergické** nebo **antagonistické**.
- Příkladem synergismu je **CAMP faktor *S. 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 pozitivity vidíme zesílenou hemolýzu ve tvaru dvou trojúhelníků, anebo motýlích křídel

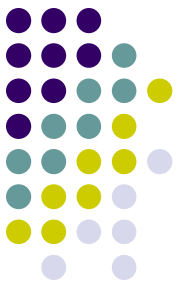
Shrnutí



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

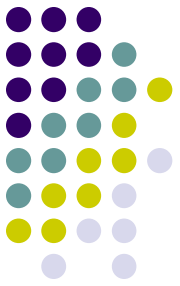


Praktický test: lahvičky se směsí antibiotik a latexových částic

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



Zapamatujte si:

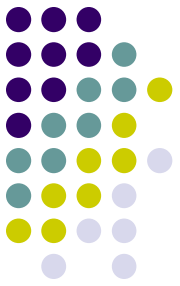


Streptokoky s hemolýzou (úplnou nebo částečnou), ale také streptokoky zcela bez hemolýzy mohou být zpravidla určovány **latexovou aglutinací** (je-li to zapotřebí). Jejich biochemická aktivita je zpravidla chabá.

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

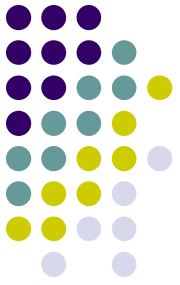
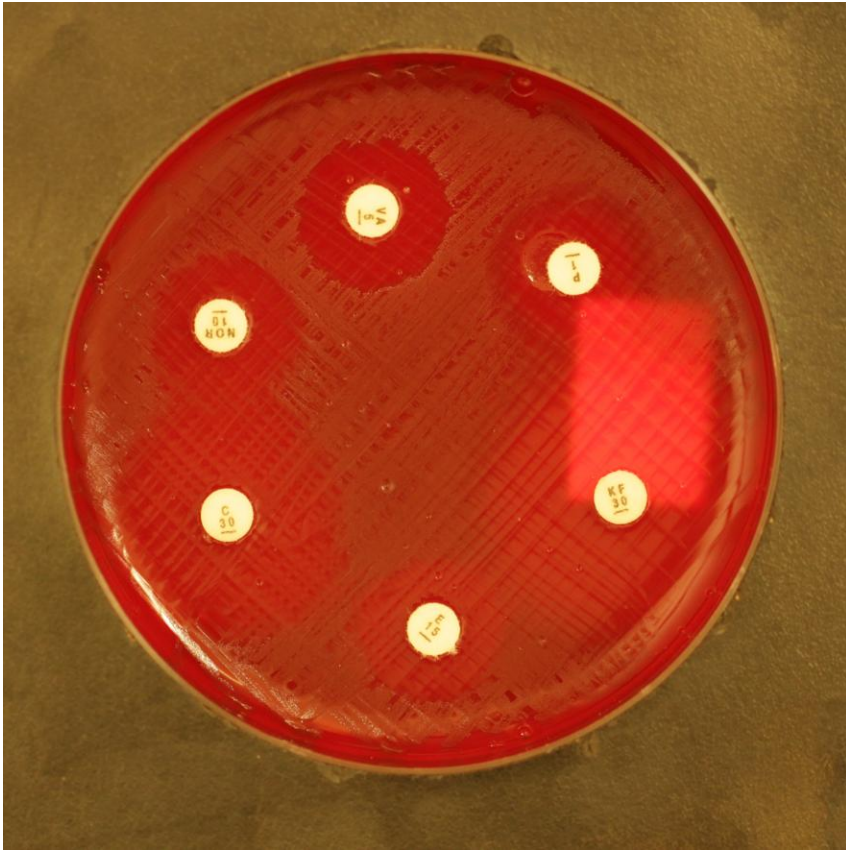


- Odečtěte difusní diskový test – změřte zóny a porovnejte s referenčními zónami
- Opět: horší patogen (pyogenní streptokok) je citlivější než mírnější patogeny
- Také si všimněte, že testy jsou provedeny na MH agaru s krvinkami nebo na krevním agaru. Na prostém MH agaru totiž většina streptokoků roste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

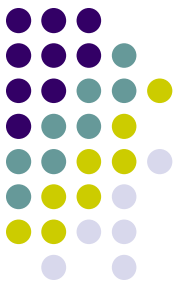
Test citlivosti na streptokoky



Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Penicilin	P	18 mm
Erytromycin	E	21 mm
Klindamycin	DA	17 mm
Chloramfenikol	C	21 mm
Tetracyklin	TE	23 mm
Vankomycin	VA	13 mm
Nitrofurantoin	F	15 mm

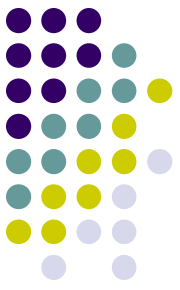


Pozdní následky streptokokových infekcí



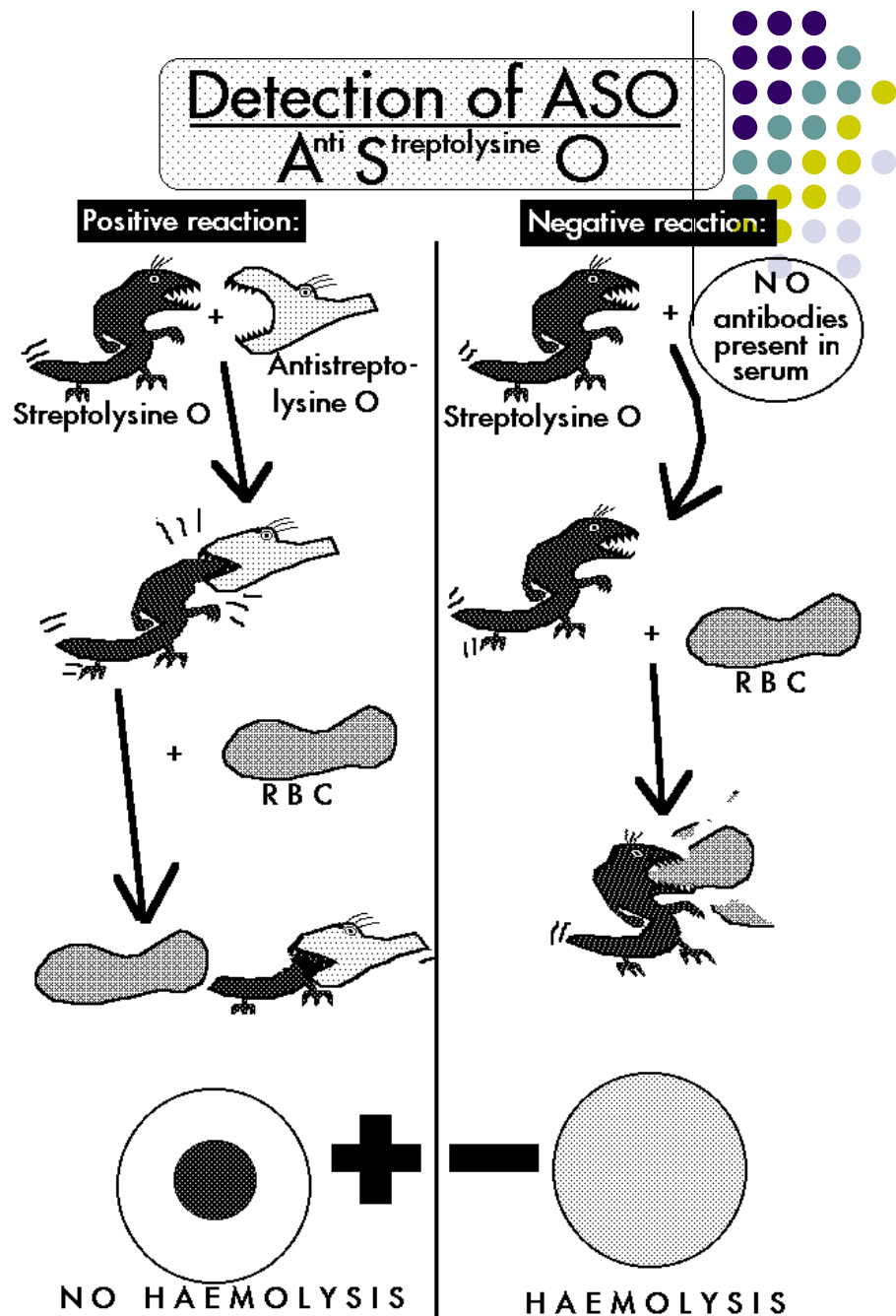
- Po každé streptokokové infekci se objevují protilátky, včetně protilátek proti streptokokovému toxinu-**streptolyzinu O**
- Někdy se stane, že množství těchto protilátek po infekci neklesá, ale naopak stoupá, omylem se místo na streptokoky **vážou na některé struktury organismu.**
- V takovém případě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

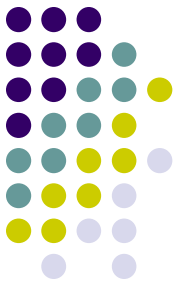


- **Panel** s pozitivní kontrolou a sedmi pacienty, ředění s koeficientem pouze 1,2
- **Titř** nad cca 200 znamená riziko, že pacient je ohrožen pozdním následky streptokokové infekce

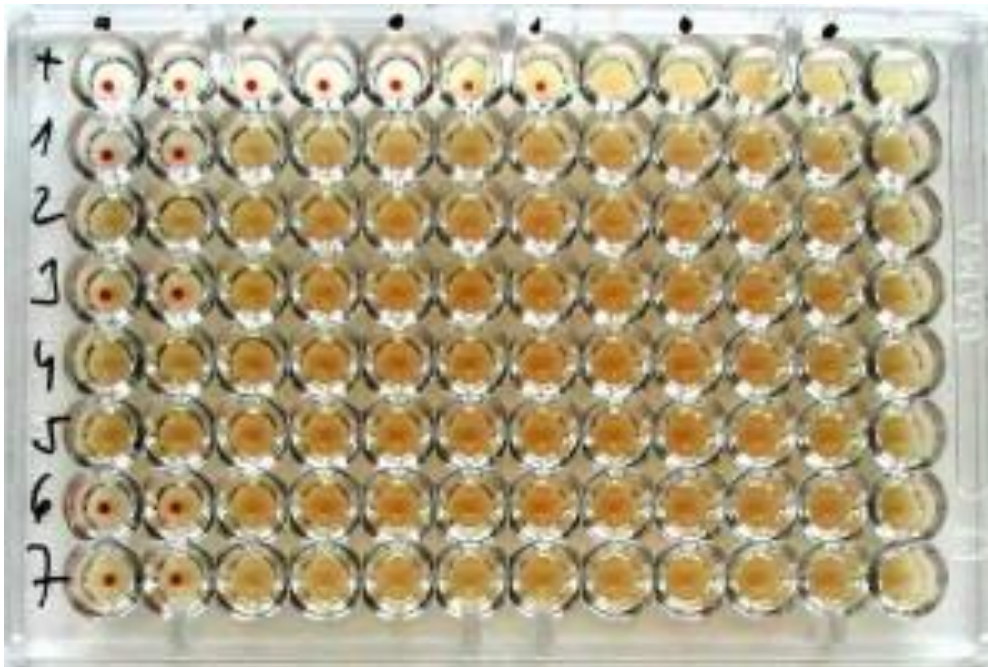
Hodnocení výsledků ASLO

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
hodnota ml.i.	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 5 pacientů.