



# **DALŠÍ G+ BAKTERIE**

## **praktikum č. 3**

Lékařská mikrobiologie – cvičení  
Mikrobiologický ústav LF MU

# Z minulých cvičení byste měli znát

---

- ▶ Základní mikrobiologické půdy
- ▶ Klinický význam stafylokoků, odlišení *S.aureus* od CoNS, význam a detekce koagulázy a hyaluronidázy, MRSA
- ▶ Biochemické metody identifikace - % pravděpodobnosti,  $T_{in}$ , kataláza, oxidáza, PYR test
- ▶ Klinický význam streptokoků, dělení dle hemolýzy, odlišení *S.pyogenes* a *S.agalactiae* (PYR test, CAMP test), určení *S.pneumoniae* (optochinový test), ASLO



# Přehled G+ bakterií

---

Cvičení	Tvar	Zástupci
P01	koky	Stafylokoky ( <i>S.aureus</i> , CoNS)
P02	koky	Streptokoky (viridující, hemolytické)
P03	koky	Enterokoky
	tyčky	Listerie, Bacily, Korynebakteria

Listerie a korynebakteria nesporulují, bacily sporulují.



# Obsah cvičení

---

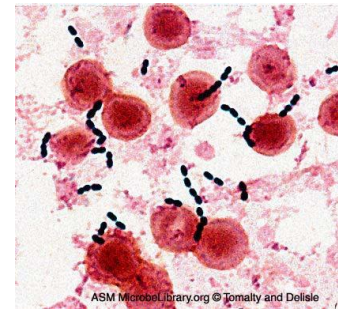
- ▶ Charakteristika enterokoků
- ▶ Charakteristika G+ tyčinek
- ▶ Léčba infekcí způsobených enterokoky a G+ tyčinkami
- ▶ Diagnostika enterokoků a G+ tyčinek
- ▶ Diferenciální diagnostika enterokoků a G+ tyčinek
- ▶ Praktické úkoly



# Charakteristika enterokoků

---

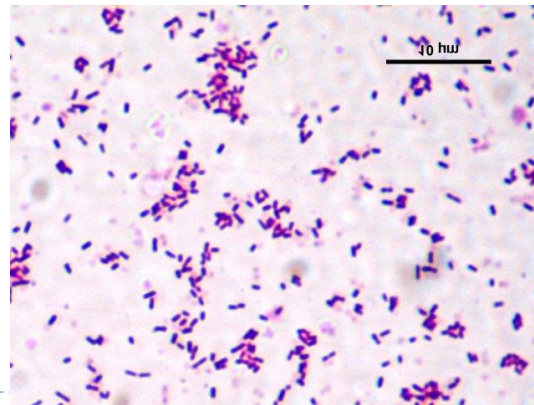
- ▶ G+ koky v drobných shlucích či krátkých řetězcích
- ▶ Vysoká odolnost – 6,5 % NaCl (pozor – stafylokoky až 10 % NaCl!), žluč, azid sodný, pH 4,8 - 11
- ▶ Kataláza NEG
- ▶ **Klinický význam:**
  - Součást normální mikroflóry střeva
  - Jedni z nejběžnějších původců **močových infekcí**
  - Nozokomiální infekce (rány, sepse, endokarditidy, implantáty, atd.)
- ▶ Primární **rezistence k cefalosporinům**
- ▶ *E. faecalis* (90%), *E. faecium* a další
- ▶ Nebezpečné **VRE** – vankomycin rezistentní enterokoky



# Charakteristika G+ tyčinek - listerie

---

- ▶ G+ krátké tyčinky
- ▶ **Výskyt:** v prostředí a potravinách (mléko, sýry, zelenina, maso, půda, listí...),
- ▶ Vysoká odolnost - růst při nízkých teplotách (4 °C – lednička, sýrárny) a vysokých koncentracích NaCl či žluči
- ▶ Kataláza POZ
- ▶ *L. monocytogenes*, *L. ivanovi*, *L. innocua* aj.



# Charakteristika G+ tyčinek - listerie

---

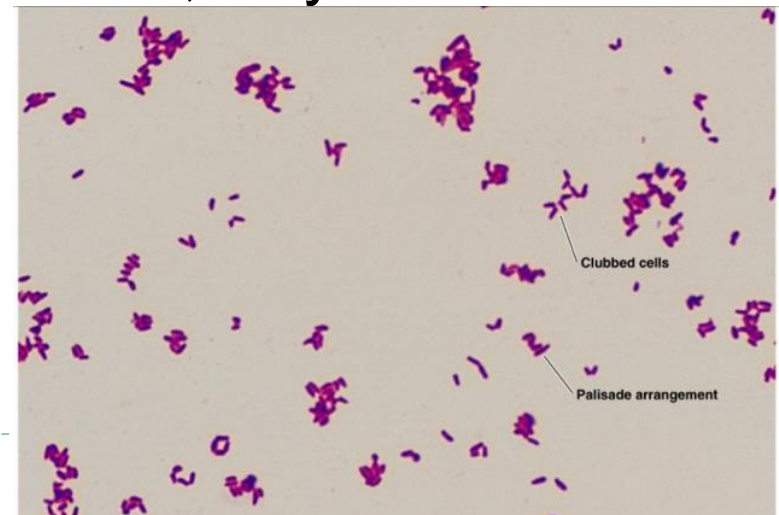
## ▶ Klinický význam:

- **Listerióza** - gastroenteritida, horečnaté onemocnění, málokdy infekce u zdravých dospělých
- Riziko pro **těhotné** - hrozí kongenitální infekce plodu přes placentu (možný potrat) nebo (ve třetím trimestru) infekce plodu, nebo také perinatální infekce při porodu (kontaminovaný poševní sekrete).
- **Novorozenci** - typická meningitida či sepse (málo časté, vysoká letalita)
- Lidé s **oslabenou imunitou** – infekce ran, sepse, meningitidy



# Charakteristika G+ tyčinek - korynebakteria

- ▶ Korynebakteria jsou grampozitivní tyčinky **kyjovitého** tvaru (koryné = kyj), některá **pleomorfní**, mohou být **gramlabilní**.
- ▶ Odolné k vyschnutí a koncentraci NaCl, ale **nerostou na MH agaru bez krve**. Tvoří palisády a tzv. havraní křídla.
- ▶ Kataláza POZ
- ▶ *Corynebacterium diphtheria* – záškrť, díky očkování vzácný
- ▶ Nedifterická (= nezáškrťová) korynebakteria – součástí běžné mikroflóry kůže.





# Charakteristika G+ tyčinek - korynebakteria

## ► Klinický význam:

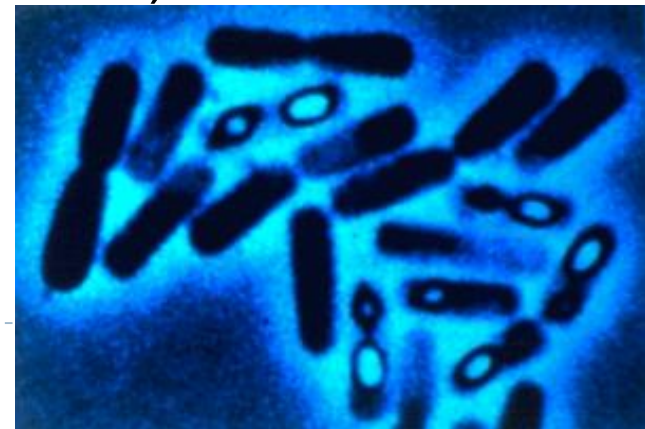
- **Záškrť** - pseudomembranózní angína (pablány, otok). Vznik pouze pokud kmen bakterie produkuje **difterický toxin** (ten do buňky vnáší tzv.  $\beta$ -fág). Charakteristický oteklý krk, při absenci terapie smrt udušením.



# Charakteristika G+ tyčinek - bacily

---

- ▶ G+ mohutné tyčinky s rovnými konci
- ▶ Pohyblivé, sporulující - jedna **endospora** (terminální, subterminální či centrální)
- ▶ Kataláza POZ
- ▶ Většina zástupců – neškodné mikroby vnějšího prostředí.
- ▶ **V klinice většinou kontaminace.**
- ▶ Několik významných zástupců – *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Geobacillus* (dříve *Bacillus*) *stearothermophilus* a *Bacillus subtilis*



# Charakteristika G+ tyčinek - bacily

---

## ▶ Klinický význam:

- ***Bacillus anthracis*** - obligátní patogen, původce veterinárního onemocnění – **antraxu** – potenciál biologické zbraně. Jedna z prvních nákaz, na kterých byla zkoušena vakcinace.
- ***Bacillus cereus*** – enterotoxikózy, infekce oka. Imunokompromitované osoby - infekce ran, endokarditidy, sepse.
- ***Geobacillus stearothermophilus* a *Bacillus subtilis*** - schopnost přežít při velmi vysokých teplotách → použití: indikátory účinnosti sterilizátorů.



# Enterokoky a G+ tyčinky: léčba

---

- ▶ Enterokoky a listerie – primární **rezistence na cefalosporin**. Enterokoky také primárně rezistentní na makrolidy, linkosamidy.
- ▶ *E.faecalis* – citlivý na ampicilin, ale *E.faecium* – primárně rezistentní.
- ▶ Možné použití ko-trimoxazolu, doxycyklinu, jako rezerva vankomycin.
- ▶ **VRE** – vankomycin rezistentní kmeny (hlavně u hematologických pacientů) → linezolid (ZYVOXID), případně dalfopristin/quinupristin (SYNERCID).



# Enterokoky a G+ tyčinky: diagnostika – přehled kultivace a mikroskopie

	Enterokoky	Listerie	Korynebakteria	Bacily
Mikroskopie	G+ koky v krátkých řetězcích	G+ tyčinky řetězí se za sebou, palisády	G+ tyčinky skládající se vedle sebe jako palisády nebo "havraní křídla"	G+ robustní tyčinky, možná sporulace
Kultivace	šedavé, většinou bez hemolýzy (ale možná viridace i hemolýza)	podobné enterokokům, hemolýza možná	velmi drobné kolonie (podobné mouce)	plstovité kolonie, někdy výrazná hemolýza

# Diagnostika: enterokoky

---

- ▶ Kataláza NEG
- ▶ Růst na žluč – eskulinové půdě, na Slanetz – Bartleyho agaru.
- ▶ Biochemie – **štěpení arabinosy** (*E. faecalis* neštěpí → půda je **zelená**, *E. faecium* štěpí → půda **žlutne**)
- ▶ Antigenní analýza - zpravidla se nepoužívá.
- ▶ Testy citlivosti – běžný MH agar. Existují i půdy na screening VRE.



# Diagnostika: G+ tyčinky

---

- ▶ Kataláza POZ u všech tří skupin (ale např. u rodu *Arcanobacterium* blízkého korynebakteriím je negativní!)
- ▶ Biochemický rozlišení koryneformních tyčinek navzájem – API Coryne, Remel)
- ▶ Diagnostika listerií – růst při nízkých teplotách, vysokých koncentracích NaCl a hemolytické interakce.
- ▶ Průkaz antigenu – průkaz difterického toxinu **Elekovým testem** (viz. dále).



# Diferenciální diagnostika: enterokoky

---

- ▶ **Gramovo barvení:** grampozitivní koky x grampozitivní tyčinky x ostatní bakterie.
- ▶ Stafylokoky odliší pozitivní **kataláza** a **růst na NaCl** (10 %!).
- ▶ Streptokoky odliší nepřítomnost **růstu na Slanetz – Bartleyho či žluč – eskulinové půdě**, popř. PYR testem (kromě *S. pyogenes* negativní).
- ▶ Vzájemné rozlišení je možné arabinózovým testem nebo složitějším testem – **ENCOCCUS** test – 8 reakcí.





# Diferenciální diagnostika: bacily

---

- ▶ **Gramovo barvení:** grampozitivní koky x grampozitivní tyčinky x ostatní bakterie.
- ▶ Bacily se navíc projeví už v Gramově barvení coby **velmi rozměrné (robustní) tyčinky**. Často, ale ne vždy, můžeme také pozorovat tvorbu **endospor**.
- ▶ **Kultivace** – velké, plst'ovité kolonie.
- ▶ Druhové určení je možné biochemickými testy, testy citlivosti na antibiotika apod.
- ▶ ***U G+ tyčinek ale není jednoznačný algoritmus!***



# Diferenciální diagnostika: listerie a koryneformní tyčinky

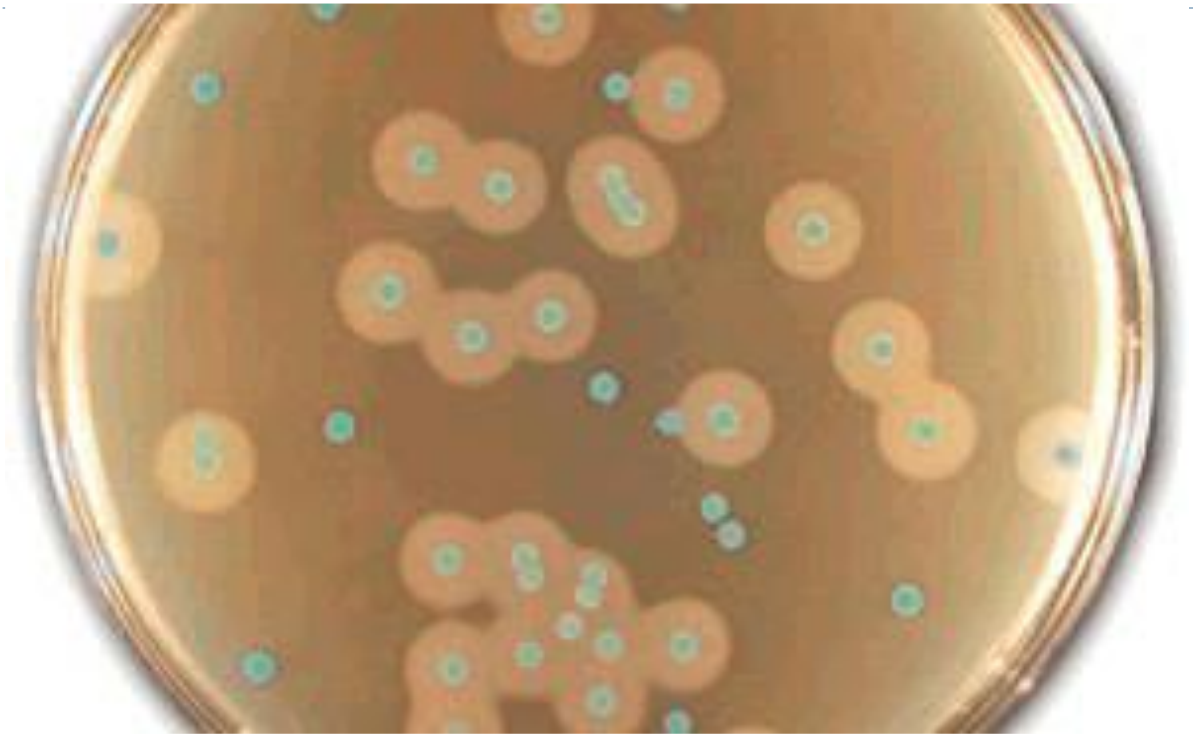
---

- ▶ **Gramovo barvení:** grampozitivní koky x grampozitivní tyčinky x ostatní bakterie.
- ▶ Nesporulují, nejsou robustní – vyloučeny bacily.
- ▶ Spolehlivější dourčení – biochemie, růst při různých teplotách (listerie 4°C), testy hemolytických interakcí.
- ▶ ***U G+ tyčinek ale není jednoznačný algoritmus!***



# Diferenciální diagnostika: listerie

---

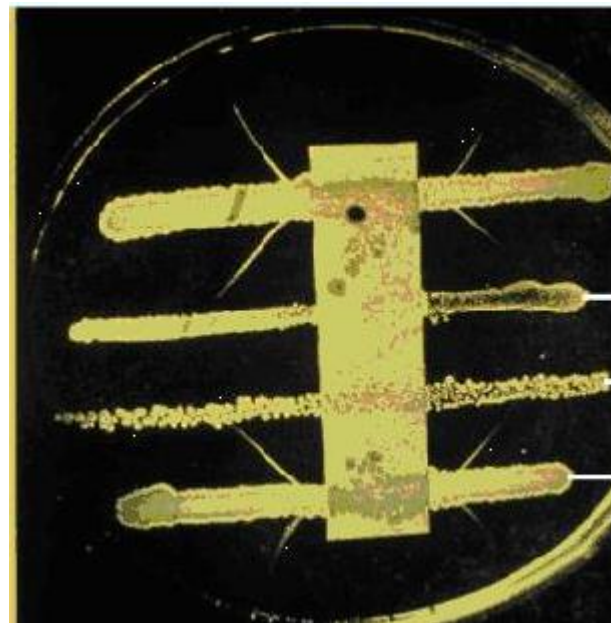


- ▶ Chromogenní půda na diagnostiku listerií – ALOA – modré zbarvení kolonií listerií, patogenní druhy mají kolem sebe tzv. HALO = odlišně zbarvené okolí.

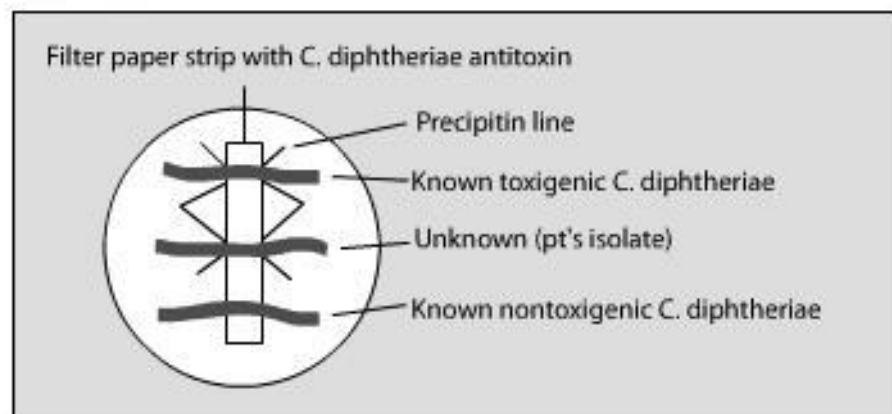


# Diferenciální diagnostika: koryneformní tyčinky

- ▶ Detekce difterického toxinu za použití speciálního papírku s antitoxinem – položen na povrch agaru, kam se posléze očkují testované kmeny.
- ▶ Pozitivní výsledek = precipitační linie.



ELEK test:



# Úkol č. 1 – Gramovo barvení

---

- ▶ Obarvěte podle Grama osm podezřelých kmenů (pro zopakování: natřít → nechat uschnout → fixovat plamenem → poté barvit: Gram 30 s → Lugol 20-30 s → **opláchnout vodou** → alkohol 15-20 s → opláchnout vodou → safranin 60 → opláchnout vodou → **osušit filtračním papírem (nedrhnout buničinou ani ničím jiným!)** → imerzní objektiv - olej)
- ▶ Odlišíte jednu G- bakterii. Zbytek budou G+ koky a tyčinky.



# Úkol č. 2 – Morfologie kolonií

---

- ▶ **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 č. 3 – Kataláza, ŽE, Slanetz-Bartley

---

- ▶ **3a) Kataláza – enterokoky negativní, G+ tyčinky pozitivní (pozitivní také G+ stafylokok, negativní také G+ streptokok).**
- ▶ **3b) Růst na Slanetz-Bartleyho půdě (přídavek azidu sodného) – rostou enterokoky.**
- ▶ **3c) Růst na žluč-eskulinovém agaru – kmen, který zde roste a zároveň neroste na Slanetz-Bartleyho půdě → *Listeria*.**



# Úkol č. 4 – Vzájemné rozlišení enterokoků

---

- ▶ **4a) Arabinózový test** – kolonie se smísily s arabinózou → inkubace. *E. faecalis* neštěpí → půda je **zelená**, *E. faecium* štěpí → půda **žlutne**.
- ▶ **4b) ENCOCCUStest** – 8 reakcí. Neurčujte index typičnosti a % pravděpodobnosti (nemáte jak).

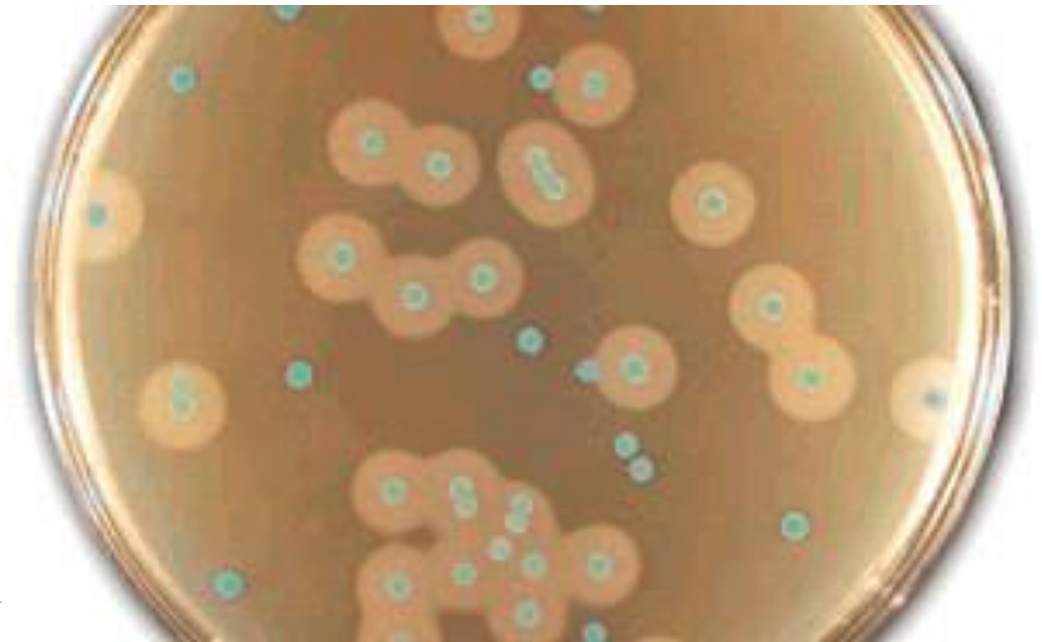




# Úkol č. 5 – Diagnostika listerií

---

- ▶ **5a) Růst při 4°C** – jediná *Listeria* dokáže růst při chladničkových teplotách (z jiných bakterií např. *Yersinia*, některé druhy pseudomonád apod.).
- ▶ **5b) Růst listerie na chromogenní půdě** – ALOA půda pro *Listeria monocytogenes* (slide 19).



# Úkol č. 6 – Testy citlivosti

---

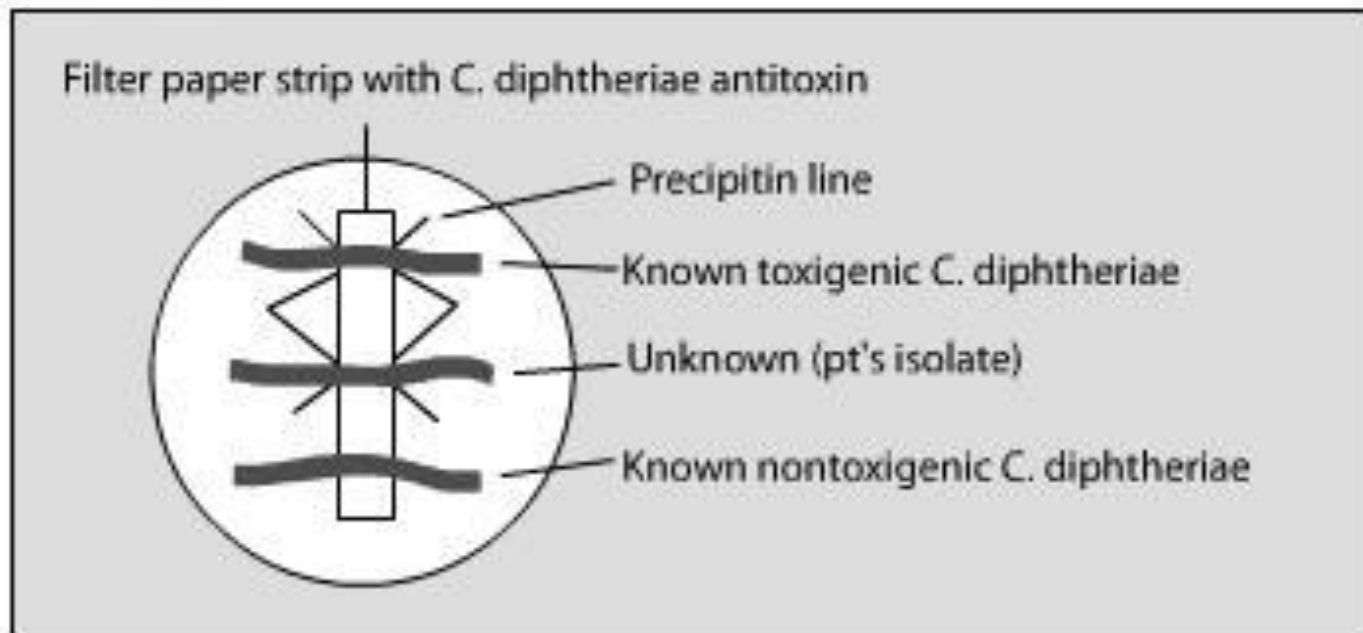
- ▶ **6a) Odečtete difúzní diskový test.** Všímejte si, které druhy potřebují pro kultivaci MH agar s přidavkem krve a které ne.
- ▶ **6b) *E.faecalis*** – citlivý na **ampicilin**, ale *E.faecium* – primárně rezistentní.
- ▶ **6c) VRE** – vankomycin rezistentní enterokoky.



# Úkol č. 7 – Elekův test

- ▶ Zakreslete výsledek Elekova testu na testování difterického toxinu. **Nezapomeňte na popisky!**

ELEK test:



# Po tomto cvičení byste měli znát:

---

- ▶ Klinický význam a diagnostiku enterokoků – jak je odlišit od stafylokoků, streptokoků. Význam zkratky VRE.
- ▶ Klinický význam a diagnostiku G+ tyčinek – které sporulují, které ne, význačné vlastnosti jednotlivých zástupců (růst při nízkých teplotách, růst na diagnostických půdách atd.).
- ▶ Možnosti terapie infekcí způsobených G+ tyčinkami a enterokoky – rezistence, léky volby.
- ▶ Princip a význam Elekova testu.

