

P02

Diagnostika streptokoků

Osnova

- rod *Streptococcus*
- dg. rodu *Streptococcus*
- úkoly

Rod *Streptococcus*

- **G+ koky, KAT-, OXI-**
- dvojice, řetízky
- nepohyblivé
- kultivace na KA
- rozdělení dle hemolýzy (α – viridující, β – hemolitické, γ – nehemolytické)
- dělení dle Lancefieldové: antigenní skupiny, nejčastěji A, B, C, E, F, G, H, ...
(skup. D – dnes enterokoky, *S. bovis*)



Přehled streptokoků

Změny na KA	
α -hemolýza (viridace)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	skupina „ústních streptokoků“
β -hemolýza	<i>Streptococcus pyogenes</i> (sk. A dle Lancefieldové)
	<i>Streptococcus agalactiae</i> (sk. B dle Lancefieldové)
	skupina „non-A-non-B“ streptokoků
γ -hemolýza (žádná)	streptokoky bez hemolýzy

Streptococcus pyogenes

- *streptos* = ohebný, zkroucený jako řetěz; *puon* = hnis; *gennao* = tvořit
- group A streptococcus (GAS)
- úplná β -hemolýza, drobné kolonie
- PYR test, bacitracinový test
- původce **akutní tonsilitidy** (angíny), **hnisavých zánětů měkkých tkání (nekrotizující fasciitis)**, **spály, erysipelu** (tzv. růže) a **flegmón** (neohraničených bakteriálních zánětů), pneumonií, meningitid, sepsí;
- pozdní následky (**revmatická horečka, akutní glomerulonefritida**) - **ASLO**



Akutní tonsilitida (angína)

- **nejčastější bakteriální původce *S. pyogenes***
- další původci: *S. pneumoniae*, staphylokoky, hemofily, influenza virus, herpes viry, coxsackie viry, EBV, ...
- horečka, oboustranná bolest v krku, zduřené uzliny



Spála (scarlatina)

- angína s exantémem a projevy na sliznici (petechie)
- streptokok produkuje **pyrogenní** (erytrogenní) **toxin**



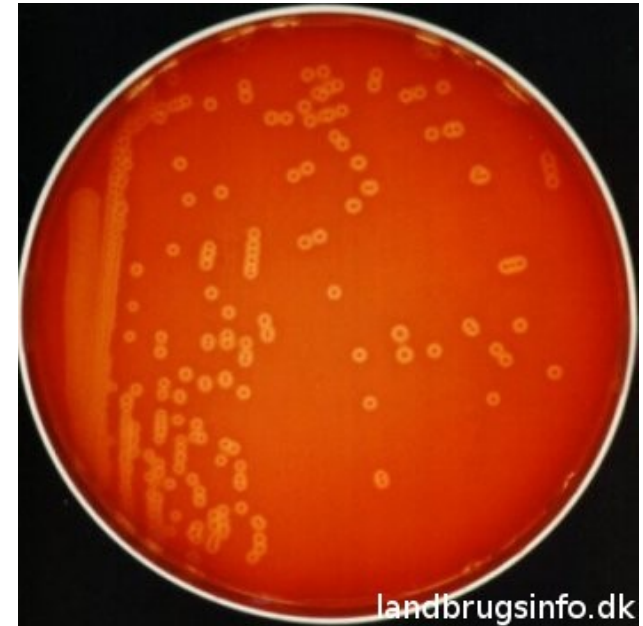
Erysipel (růže)

- ostře ohraničený zánět, nejčastěji v oblasti bérců a obličeji
- infekce kůže se šíří do kožních lymfatických cév, při opakovaném poškození chronické lymfatické otoky



Streptococcus agalactiae

- *agalactia* = porucha tvorby mléka (záněty mléčné žlázy především u krav)
- group B streptococcus (GBS)
- neúplná β -hemolýza, větší kolonie
- pozitivní CAMP test
- **původce močových infekcí** (u žen v urogenitálním traktu a GIT)
- **infekce novorozenců** (**seps**e, pneumonie, meningitidy)
- infekce gravidních žen



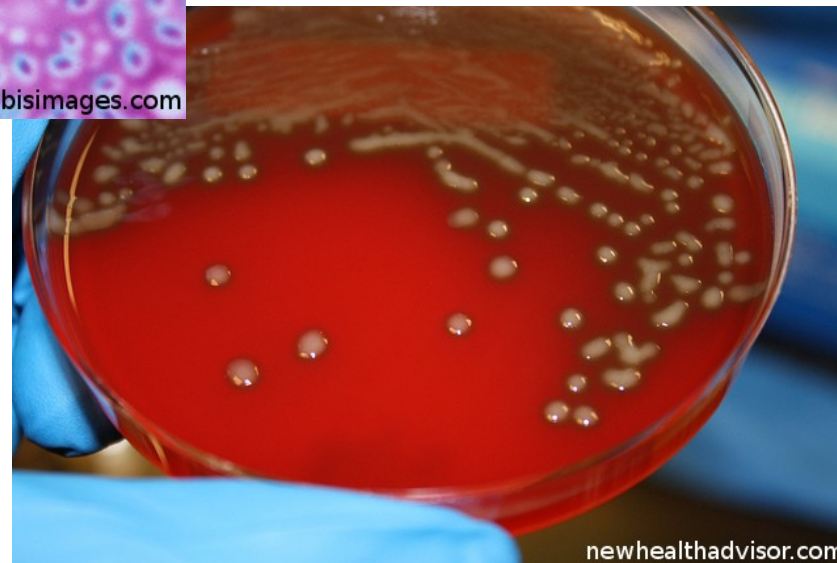
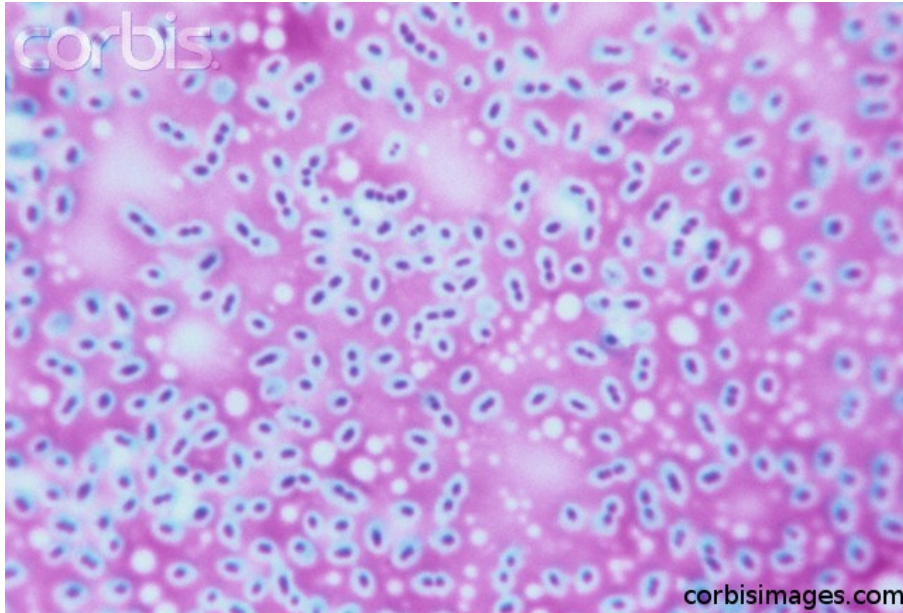
„non-A-non-B“ streptokoky

- β -hemolýza, ale nepatří ani do GAS (*S. pyogenes*) ani do GBS (*S. agalactiae*)
- **faryngitidy** (záněty hltanu), často přítomny bez klinických projevů
- *S. dysgalactiae*, *S. equi*
- **obyčejně se neurčují**, v případě potřeby se blíže identifikují průkazem antigenu

Streptococcus pneumoniae

- „pneumokok“, dříve *Diplococcus pneumoniae*
- **dvoří dvojice** (nikoli řetízky), **lancetovitý** (kopíčkovitý) tvar buněk
- **α -hemolýza**
- opouzdřené buňky mají hlenovité kolonie (kapky oleje)
- v R-fázi netvoří pouzdro
- v malém množství i u zdravých osob
- **sinusitidy, pneumonie, otitis media, meningitidy, sepse, endokarditidy**
- nepovinné očkování (Pneumo23, Prevenar13, Synflorix)

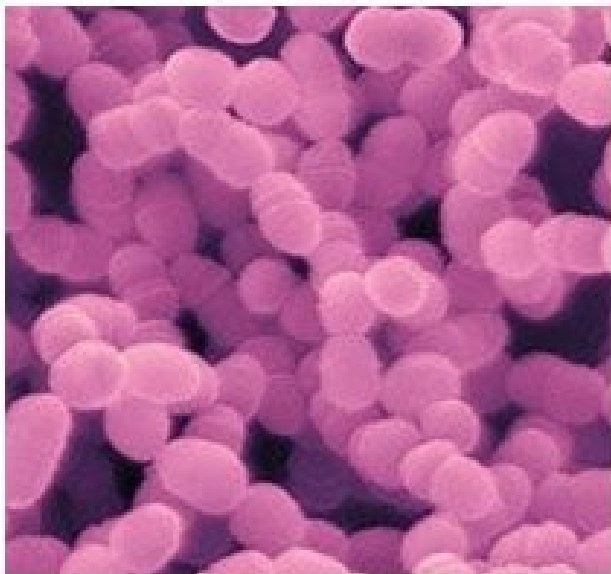
Streptococcus pneumoniae (2)



„Ústní streptokoky“

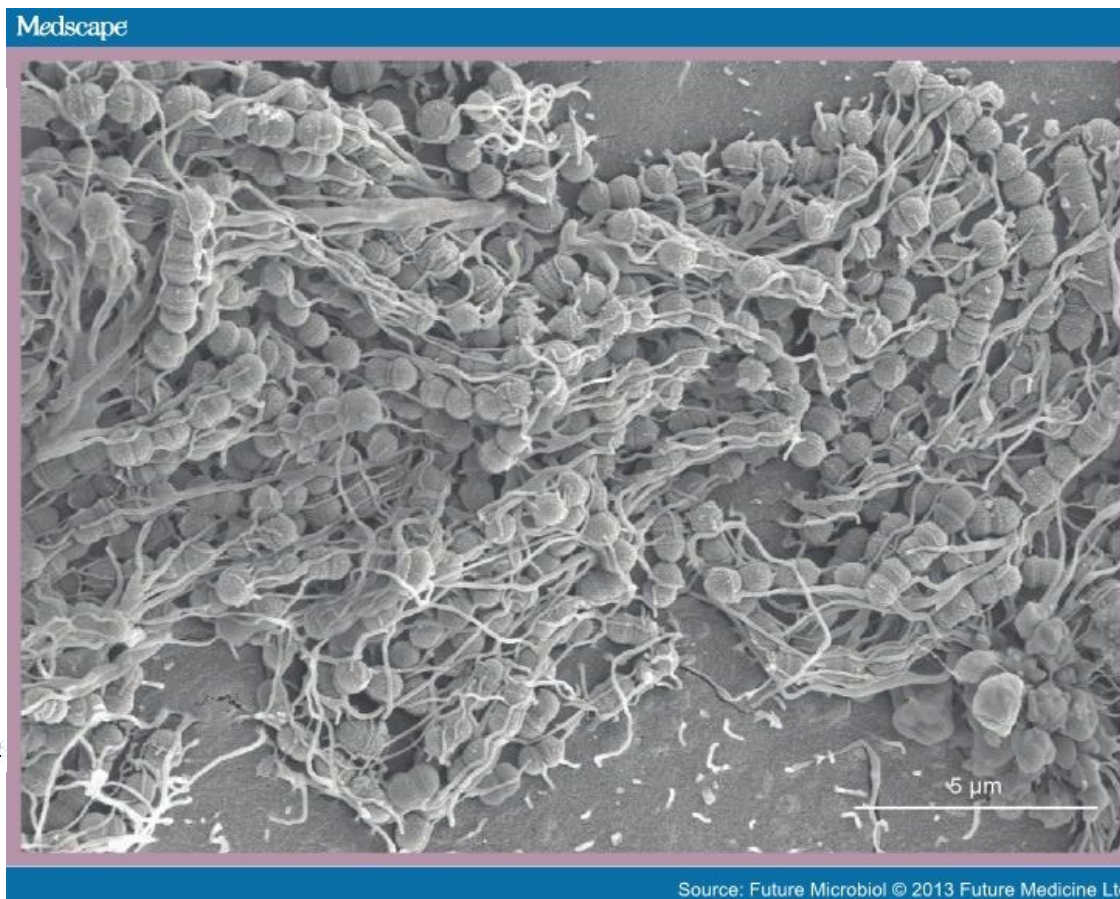
- též alfa streptokoky nebo viridující streptokoky (obvykle α -hemolytické streptokoky, kromě pneumokoka)
- normální součástí mikroflóry ústní dutiny a částečně i faryngu
- fyziologicky se neustále dostávají v malém množství do krve (ve velkém množství způsobují **subakutní bakteriální endokarditidy** - adherují na poškozené srdeční chlopně)
- útvar na chlopni = „vegetace“ - forma biofilmu (matrix tvoří krevní destičky a fibrin)
- *S. mutans* - **zubní kaz** (nejrychleji tvoří org. kyseliny)
- *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*

„Ústní streptokoky“ (2)



Streptococcus mutans

Source: microbiologyfall2010.wikispaces.com



Streptococcus salivarius K12
adherovaný k HEp-2 buňkám

Léčba

- lék volby **penicilin**
- při prokázaných alergiích **makrolidy**
- léky další volby doxycyklin, kotrimoxazol, ampicilin, aj.
- rezervní ATB **vankomycin** (zatím žádné rezistence)

- testování in vitro citlivosti – difuzní diskový test na **MH agaru s krvinkami** (na obyčejném MH agaru prakticky nerostou)

Diagnostika streptokoků

- **mikroskopie:** G+ koky
- **kultivace:** na KA kolonie šedé až bezbarvé, většinou drobné, *S. agalactiae* má větší kolonie
- **hemolýza:** α - β - i γ -hemolýza
- **nerostou** na KA s 10 % NaCl (půda pro stafylokoky), ani na Slanetz-Bartley či žluč-eskulinové půdě (pro enterokoky)
- **KAT-, OXI-**
- **rezistentní na aminoglykosidy** (společně s enterokoky)

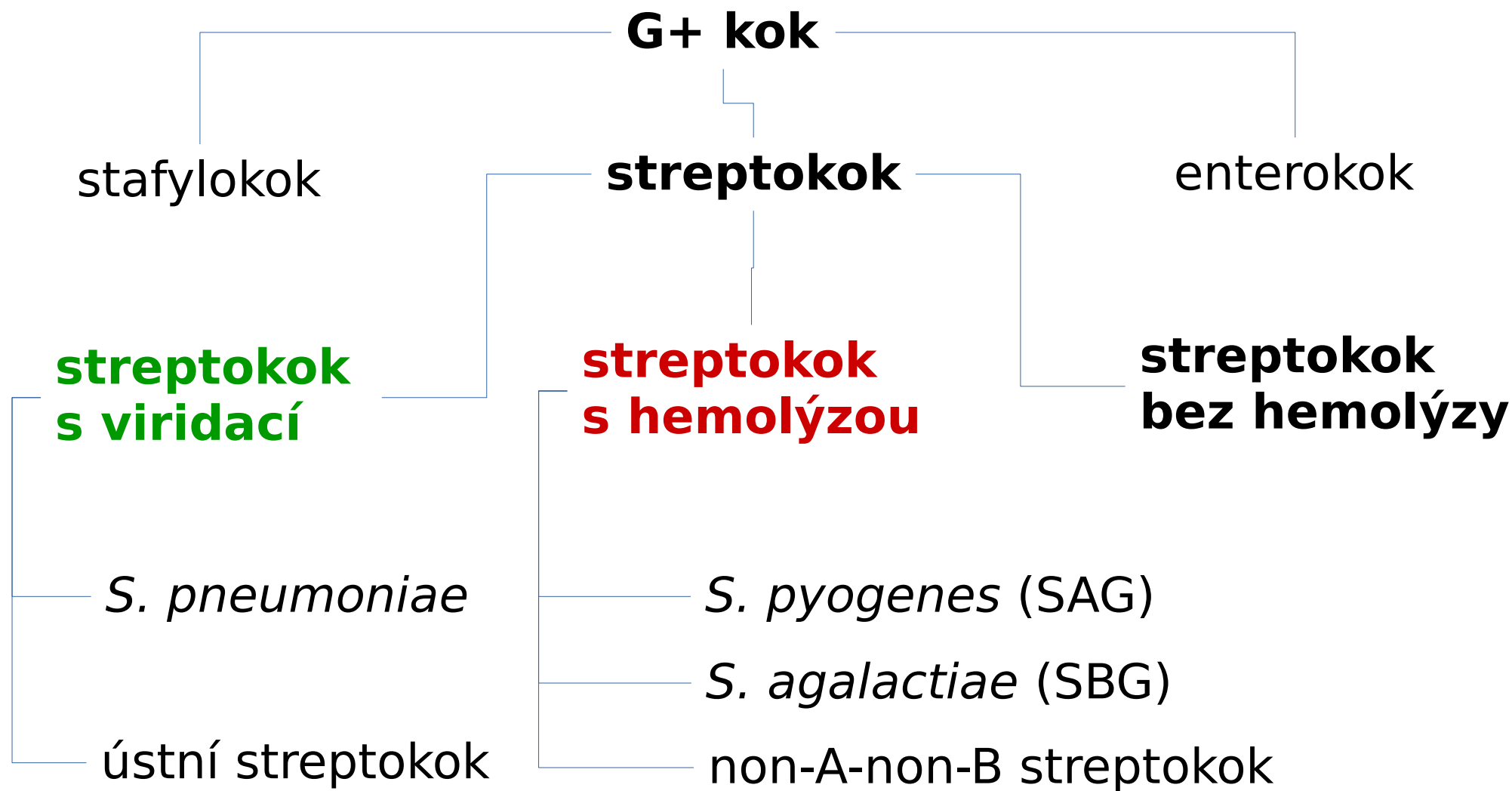
Diagnostika streptokoků (2)

- **streptokoky s α -hemolýzou (viridací)**
Ize dále určovat **biochemickými testy**
- např. při nálezů v hemokultuře nebo likvoru dourčujeme původce
- vzorek z dutiny ústní či krku nikoliv, jsou tam běžnou flórou
- **streptokoky s β - a γ -hemolýzou** lze dále určovat **latexovou aglutinací** (protože mají slabou biochem. aktivitu)
- určení non-A-non-B streptokoků dle Lancefieldové

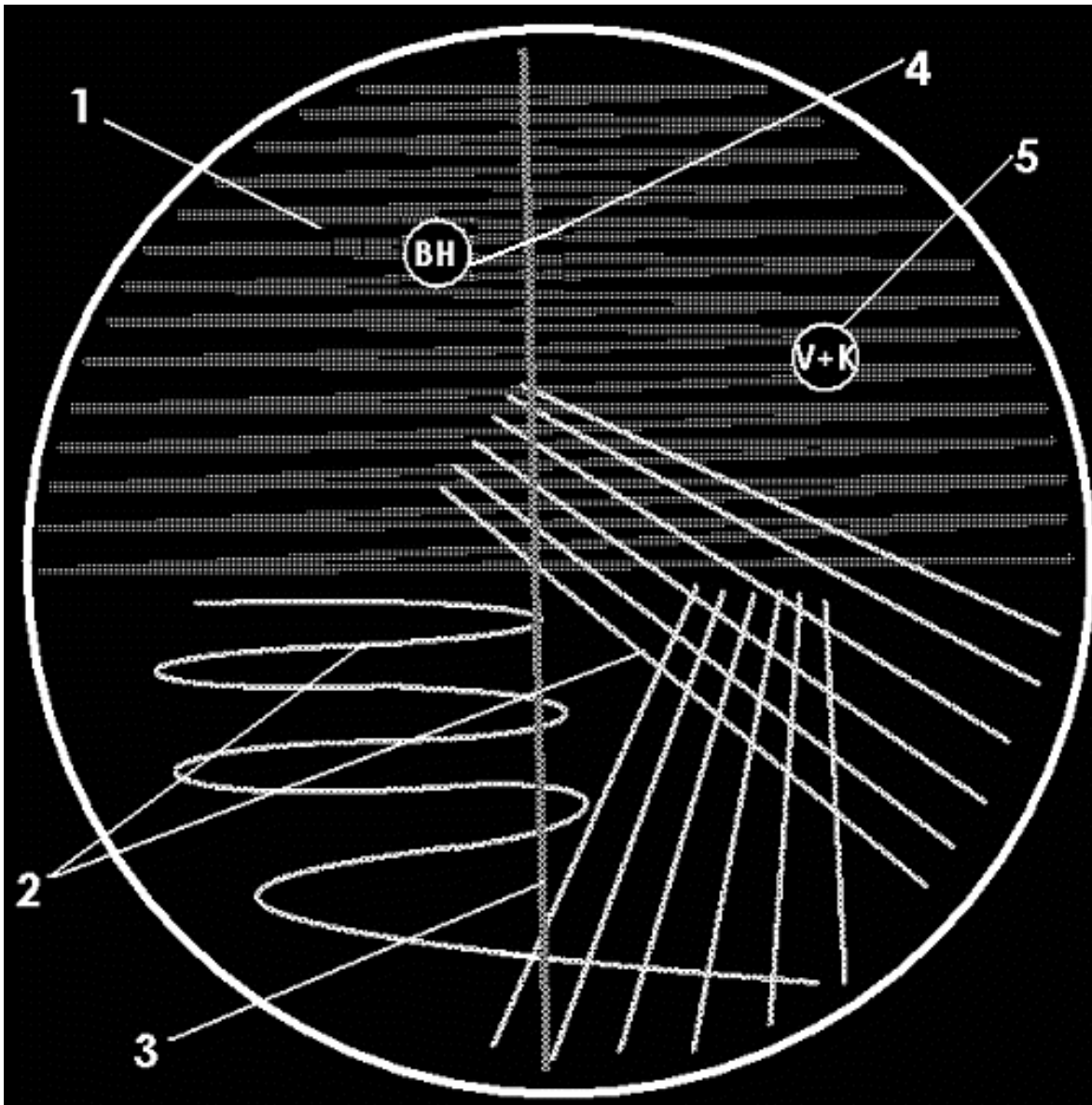
Diferenciální dg. streptokoků

- **hodnotíme hemolýzu** (viridace, hemolýza částečná či úplná, bez hemolýzy)
- **β-hemolýza:**
 - ***S. pyogenes*** (poz. **PYR test** a bacitracinový test)
 - ***S. agalactiae*** (poz. **CAMP test**)
- **α-hemolýza:**
 - ***S. pneumoniae*** poz. **optochinový test** na rozdíl od ostatních viridujících streptokoků

Diferenciální dg. streptokoků (2)



Vyhledávání respiračních patogenů



- 1) očkováno tamponem
 - 2) očkováno kličkou
 - 3) stafylokoková čára
 - 4) disk BH (bacitracin pro hemofily)
 - 5) disk V+K (vankomycin a kolistin pro meningokoky)
- na celé naočkované ploše pátráme po hemolytických streptokokcích (bezbarvé) a po stafylokocích (spíše bílé či zlatavé)

Vyhledávání respiračních patogenů (2)

bacitracinový disk může být umístěn buďto na stafylokokovou čáru, nebo cca 1 cm od ní, používají se oba způsoby



v těchto místech hledáme hemofily



Úkol 1: Mikroskopie kmenů

- **obarvěte podle Grama všech osm kmenů**
- jeden z kmenů bude G- tyčinka (výsledek si poznamenejte a dále s ním nebudeme pracovat)

Úkol 2: Kultivační a biochem. testy

- **Úkol 2a: Katalázový test k odlišení stafylokoků**
 - kolonie vmícháme do kapky H_2O_2
 - **POZ = bublinky** (stafylokok → dále s kmenem nepracujeme)
 - NEG (streptokok nebo enterokok)
- **Úkol 2b: Růst na Slanetz-Bartleyově agaru**
 - **POZ = růst kmenu** (enterokok → dále s kmenem nepracujeme)
 - stejnému účelu sloužila i žluč-eskulinová půda

Úkol 3: Kultivace na KA

- **pozorujte a запиšte typ hemolýzy** (viridace, částečná hemolýza, úplná hemolýza, beze změny)
- **popište další vlastnosti kolonií** (snažte si povšimnout rozdílů mezi jednotlivými kmeny, tj. různých velikostí, pigmentace, typu hemolýzy apod.)

Úkol 4: Streptokoky s viridací

- **Úkol 4a: Optochinový test**
 - odlišení *S. pneumoniae* od ostatních viridujících streptokoků
 - **pneumokok je citlivý k optochinu**, neměříme zónu inhibice (optochin se dnes již nepoužívá léčebně, zůstal jen v diagnostice)
- **Úkol 4b: Biochemické určení „ústního“ streptokoka**
 - streptokoky z likvoru a hemokultur
 - **STREPTOtest 16 (17 reakcí: 1. je VPT, 2. až 9. jsou v prvním řádku, 10. až 17. jsou ve druhém řádku)**

Úkol 5: Streptokoky s hemolýzou

- **Úkol 5a: PYR test**

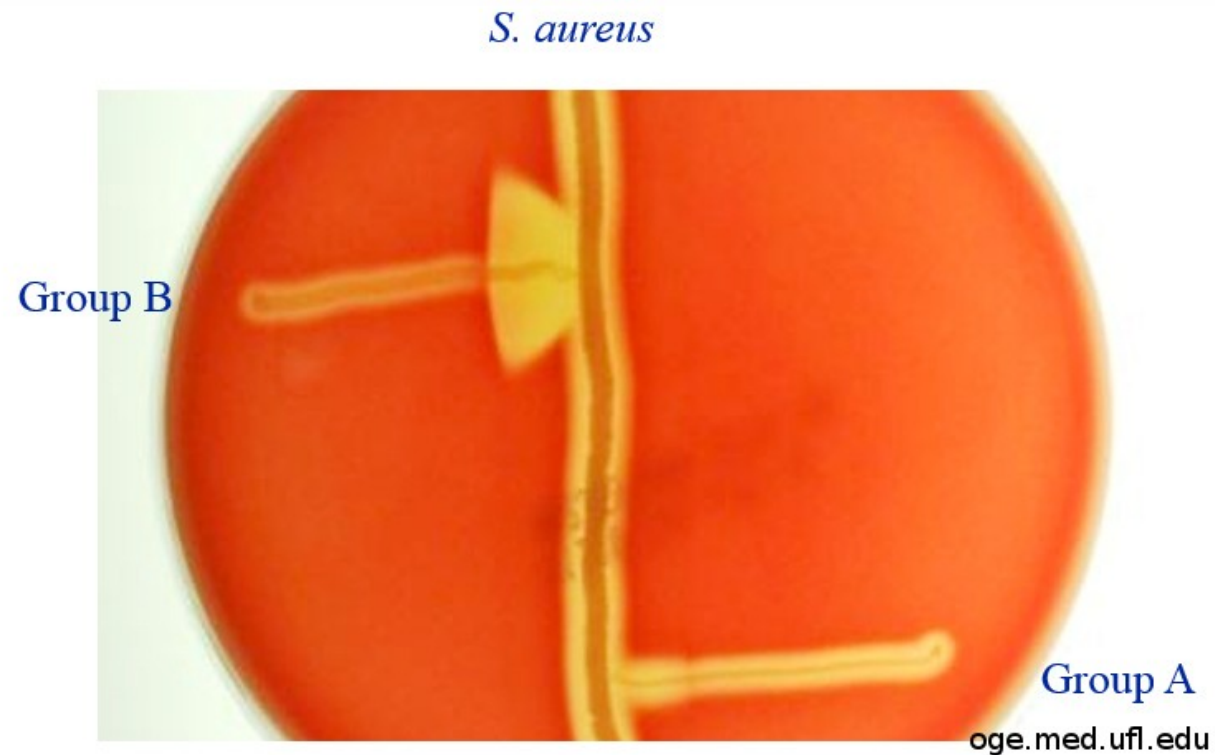
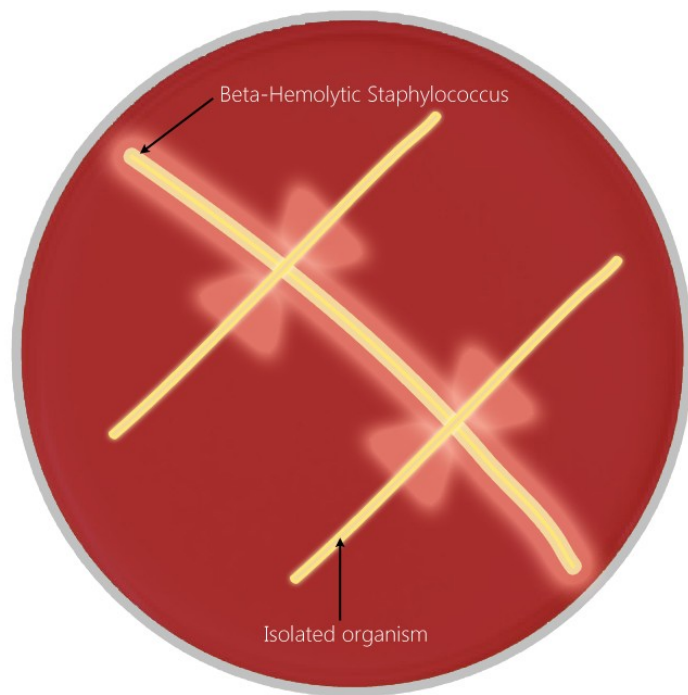
- diagnostický proužek
- kolonie se umístí na reakční plošku proužku, po 10 minutách se přikápně činidlo
- **POZ = červené zbarvení**

- **Úkol 5b: CAMP test**

- příklad synergického působení dvou hemolyzinů, a to **hemolyzinu *S. agalactiae* a β -hemolyzinu *S. aureus***
- **nelze použít k dg. *S. aureus*** (ne všechny zlaté stafylokoky produkují β -hemolyzin)

Úkol 5b: CAMP test

- na agar se naočkuje laboratorní **kmen zlatého stafylokoka** tvořící β -hemolyzin, **kolmo k němu se očkují testované kmeny**



Úkol 6: test citlivosti na ATB

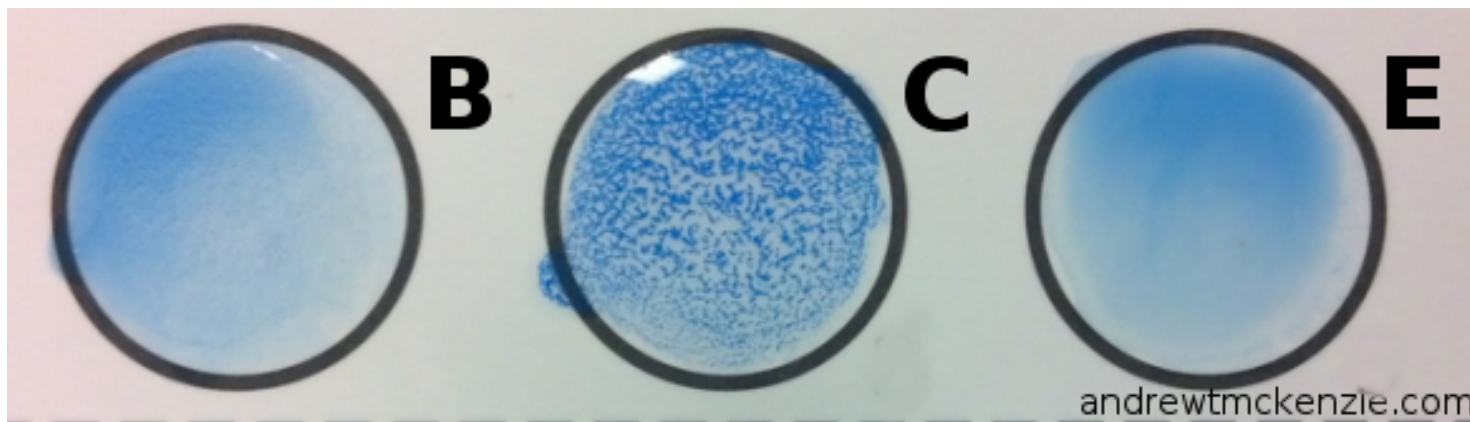
- odečtete difusní diskový test – změřte zóny a porovnejte s referenčními hodnotami
- **horší patogeny většinou citlivější** než mírnější patogeny
- využíváme **MH agar s krvinkami** (na běžném MH by většina streptokoků nevyrostla)

Precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích

- **precipitace:** antigeny jsou ve formě izolovaných makromolekul (**rozpustné koloidní antigeny**)
- **aglutinace:** antigen je součástí buňky mikroba (pracujeme s celými mikroby, **antigen je korpuskulární**)
- **aglutinace na nosičích: precipitace převedená na aglutinaci;** původně izolované **koloidní antigeny jsou navázány na cizí částici** - nosič (latex, erytrocyt, polycelulóza atp.)

Úkol 7a: aglutinační test

- lahvičky se směsí latex. částic s navázanými protilátkami
- z obrázku určete, se kterým testovaným sérem kmen aglutinuje



Neutralizační reakce

- serologické metody, při nichž **protilátka brání běžným projevům antigenu** (nejčastěji viru)
 - virus neutralizační test:
 - Ab neutralizuje infekčnost viru
 - buněčná (tkáňová) kultura naočkovaná směsí viru s Ab zůstane beze změny (metabolický efekt, pH, fenolová červeň)
 - hemaglutinačně inhibiční test (HIT)
 - v přítomnosti Ab není virus schopen aglutinovat erytrocyty (nikoli hemolyzovat!)
 - **ASLO = průkaz antisteptolyzinu O** (protilátky schopné vyvolat autoimunitní reakci), není to nepřímý průkaz

Úkol 7b: ASLO (dg. pozdních následků streptokokových infekcí)

- po každé streptokokové infekci tvorba Ab, vč. **Ab proti streptolyzinu O (streptokokový toxin)**
- v případě, že množství těchto protilátek po infekci stoupá, **zkříženě reagují** s některými strukturami organismu → **pozdní následky streptokokových infekcí**
- **revmatická horečka, akutní glomerulonefritida**
- **ASLO: zjištění míry protilátkové odpovědi** po prodělané streptokokové infekci (**neprokazujeme tedy infekci** - ta už proběhla - **ale zda nedochází k vývoji autoimunitní reakce**)
- hledáme přímo protilátky (ne patogen) → ASLO tedy není nepřímý průkaz (patogenu)

Úkol 7b: Dg. pozdních následků streptokokových infekcí - ASLO

- po každé streptokokové infekci protilátky, vč. protilátek proti streptolysin O (streptokokový toxin)
- v případě, že množství těchto protilátek po infekci stoupá, zkříženě reagují s některými strukturami organismu → **pozdní následky streptokokových infekcí**
- **revmatická horečka, akutní glomerulonefritida**
- **ASLO**: zjištění míry **protilátkové odpovědi** po prodělané streptokokové infekci (**neprokazujeme tedy infekci** - ta už proběhla - ale zda nedochází k vývoji autoimunitní reakce)

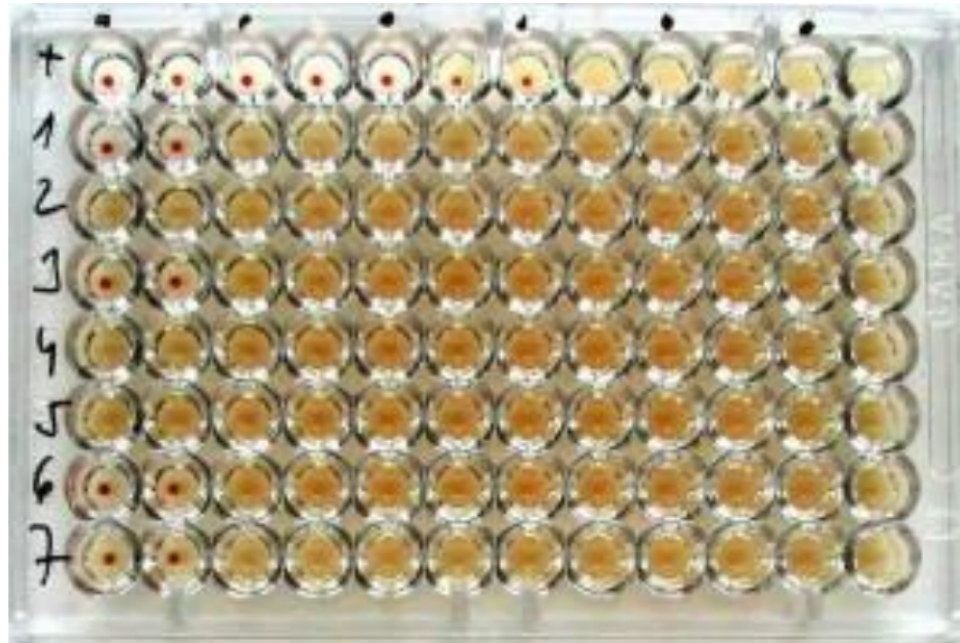
Úkol 7b: ASLO

- **neutralizace hemolýzy**
- streptolysin O za běžných okolností (nepřítomnost protilátek) hemolyzuje červené krvinky
NEG = hemolýza
- v přítomnosti protilátky antistreptolysinu O dochází k zábraně hemolýzy a krvinky mohou sedimentovat
POZ = zábrana hemolýzy
- **titr nad cca 200 m.j. riziko pozdních následků**

Jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hodnota m.j.	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911
Pozdní následky	nehrozí				hra- ničn í	hrozí						

Úkol 7b: ASLO (2)

- **destička se odečítá naležato, první řádek je pozitivní kontrola**
- další řádky jsou jednotliví pacienti
- hodnoty ředění jsou uvedeny v protokolu



Po tomto cvičení byste měli umět:

- popsat zástupce rodu *Streptococcus*, vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- zhodnotit možnost tvorby biofilmu na srdečních chlopních a případných následků tohoto stavu
- vysvětlit význam testu ASLO a vysvětlit vztah k pozdním následkům streptokokových infekcí