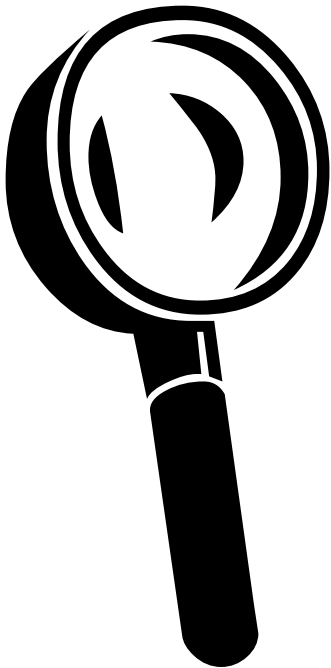


# Mikrobiologický ústav uvádí NA STOPĚ PACHATELE

Díl třetí:

- 1) Přímý průkaz II – identifikační metody
- 2) Další grampozitivní pachatelé (enterokoky, G+ tyčinky)



Autor prezentace: Ondřej Zahradníček (kontakt: [zahradnicek@fnusa.cz](mailto:zahradnicek@fnusa.cz)). K praktickému cvičení pro Bi7170c

# Hlavní obsah

Identifikační metody

Enterokoky a G+ tyčinky

Enterokoky – bonus

# IDENTIFI- KAČNÍ METODY

# Přehled podkapitol této části prezentace

Identifikační metody – obecné principy

Identifikační metody – problémy & řešení

Identifikační metody – praktické postupy (detaily uvnitř)

Identifikační metody – jiné než substrátové

Novinky v identifikačních metodách

**Kontrolní otázky**

Identifikační  
metody –  
obecné  
principy

# Postavení v systému metod

- Přímé metody (mikrob – část – produkt):
  - Mikroskopie – průkaz ve vzorku i identifikace
  - Kultivace – průkaz ve vzorku i identifikace
  - **Biochemické a jiné identifikační metody – jen identifikace!**
  - Průkaz antigenu – průkaz ve vzorku i id.
  - Průkaz nukleové kyseliny – zpravidla jen průkaz ve vzorku
  - Pokus na zvířeti – zpravidla průkaz ve vzorku
- Nepřímé metody (protilátky)

# Mezi bakteriemi (i třeba kvasinkami) jsou rozdíly v metabolismu

- Je velký rozdíl, jestli bakterie provádějí **fermentaci** nebo **aerobní respiraci**
- Je rozdíl, jestli bakterie štěpí spíše **bílkoviny a aminokyseliny** (například rod *Proteus*) nebo spíše **cukry** (například rod *Klebsiella*)

***Často je štěpení určitého substrátu znakem adaptace na určité prostředí (dobře adaptované enterobakterie štěpí laktózu, kterou nacházejí v našem střevě)***

# Obecný princip biochemických testů

- Bakterie mají svůj **specifický metabolismus**
- **Průmyslová mikrobiologie** využívá bakteriálního metabolismu (zejména fermentativního katabolismu) k výrobě různých látek, včetně řady potravin
- **Klinická (i obecná) mikrobiologie** využívá vzájemných rozdílů v metabolismu mezi bakteriemi k jejich vzájemnému rozlišování
- *Zajímají nás přitom mezidruhové rozdíly. Rozdíly mezi různými kmeny stejného druhu jsou spíše na obtíž*

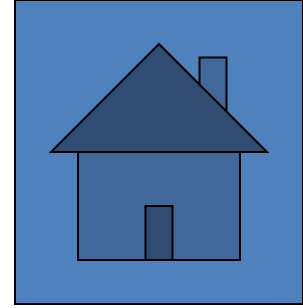


# Obecný princip II

- Bakterii předložíme určitý **substrát** a zkoumáme, zda ho bakterie pomocí svého enzymu změní v **produkt(y)**. Alespoň jeden produkt se musí lišit od substrátu **skupenstvím** či **barvou**. Neliší-li se, použijeme vhodný **indikátor** (*bud' je v reakci přítomen od počátku, nebo ho přidáme jako činidlo na závěr testu*)
- **Existuje přitom velké množství způsobů technického provedení tohoto typu testů.**

*I mezi savci jsou rozdíly. Člověk neumí tvořit vitamin C, někteří savci ano*

# Poznámka



*Ne všechny biochemické vlastnosti bakterií studujeme speciálními testy. Některé zjistíme i při kultivaci na diagnostických nebo selektivně-diagnostických půdách. Například Endova půda v sobě vlastně zahrnuje biochemický test: rozlišuje bakterie na ty, které umějí štěpit laktózu, a ty, které to neumějí.*

Foto O. Z.



# Identifikační metody – problémy a řešení

# Problémy

- Rozdíly jsou **i mezi kmeny stejného druhu, nejen mezi druhy**
- Málokdy pozorujeme, že 100 % či 0 % kmenů určitého druhu tvoří daný enzym
- Častěji je to 90 %, 10 %, 70 %, 30 %...
- Jak to třeba může vypadat v praxi:  
*Janičkella* tvoří lenkulázu v 90 % případů  
*Evičkella* tvoří lenkulázu v 10 % případů  
***Lenkuláza-pozitivní mikrob = ???***  
*typická Janičkella ???*  
*atypická Evičkella ???*

# Problémy – řešení

- **Sledujeme-li jen jeden znak**, je velká pravděpodobnost, že narazíme na atypický kmen a identifikace bude chybná
- Je však velmi **malá pravděpodobnost, že by se kmen choval atypicky např. v deseti různých testech najednou**
- Proto **čím víc testů, tím větší pravděpodobnost, že se nepleteme**
- Větší počet testů nám zároveň také umožní **vzájemně rozlišit více druhů (rodů)**

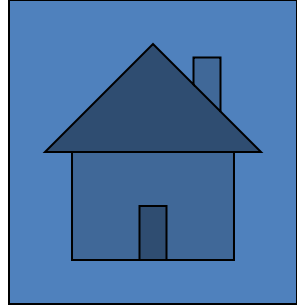
# Pravděpodobnost výsledku

- Jak jsme si řekli, **čím více testů použijeme, tím máme lepší šanci, že se nepleteme**
- Přesto tato **šance nikdy není celých 100 %**
- Dá se vždy říci například, že náš hypotetický kmen je
  - na 99,3 % *Janičkella elegans*
  - na 0,5 % *Evičkella pulcherima*
  - na 0,2 % něco úplně jiného
- Je pak na zvážení identifikujícího, zda mu taková míra pravděpodobnosti stačí, nebo provede další rozlišující testy

# Nejen procento pravděpodobnosti, ale i index typičnosti kmene

- Ve skutečnosti je výsledek biochemické identifikace zpravidla charakterizován dvěma čísly, nikoli jen jedním:
  - **% pravděpodobnosti:** např. že je 90% pravděpodobnost, že kmen opravdu je *Janičkella elegans* a ne něco jiného
  - **Index typičnosti:** míra shody s „ideálním kmenem“ *Janičkella elegans*. Pokud je kmen ideální, je  $T_{in} = 1,00$ ; pokud kmen např. netvoří lenkulázu, ačkoli 90 % janičekel ji tvoří, bude  $T_{in}$  nižší než 1,00

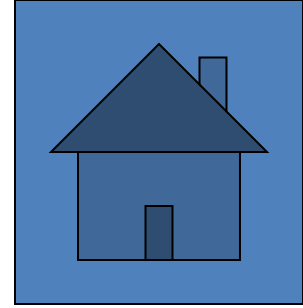
# Příklady



- **Kmen má identifikaci 99 %, index typičnosti 0,95.** Ideální stav, pravděpodobně „je to ono“.
- **Kmen má identifikaci 99 %, ale index typičnosti jen 0,63.** Může jít o atypický kmen (je dobré zjistit, který test „mluví proti identifikaci“), ale také o chybu diagnostiky
- **Index typičnosti pro dva taxony vychází shodně 1,00, procento pravděpodobnosti má každý 49,5 % (jedno procento zbývá na „jiné“).** To znamená, že je to prakticky určitě jeden z nich, ale bez rozlišujících testů nezjistíme, který to je.



Identifikační  
metody –  
praktické  
provedení



# Možnosti praktického provedení

- **Rychlé testy (vteřiny až minuty)**

Katalázový test

Testy s diagnostickými proužky (oxidáza a jiné)

- **Testy s inkubací (hodiny až dny)**

Jednoduché zkumavkové testy

Složité zkumavkové testy

Sady zkumavek

Testy v plastové destičce

– Jiné testy (např. Švejcarova plotna)

# Katalázový test

- **Katalázový test:** velmi jednoduchý, do substrátu (roztok  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) rozmícháme bakterie. Bublinky = pozitivita.

**Princip:**  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

- Konkrétní příklady použití tohoto testu

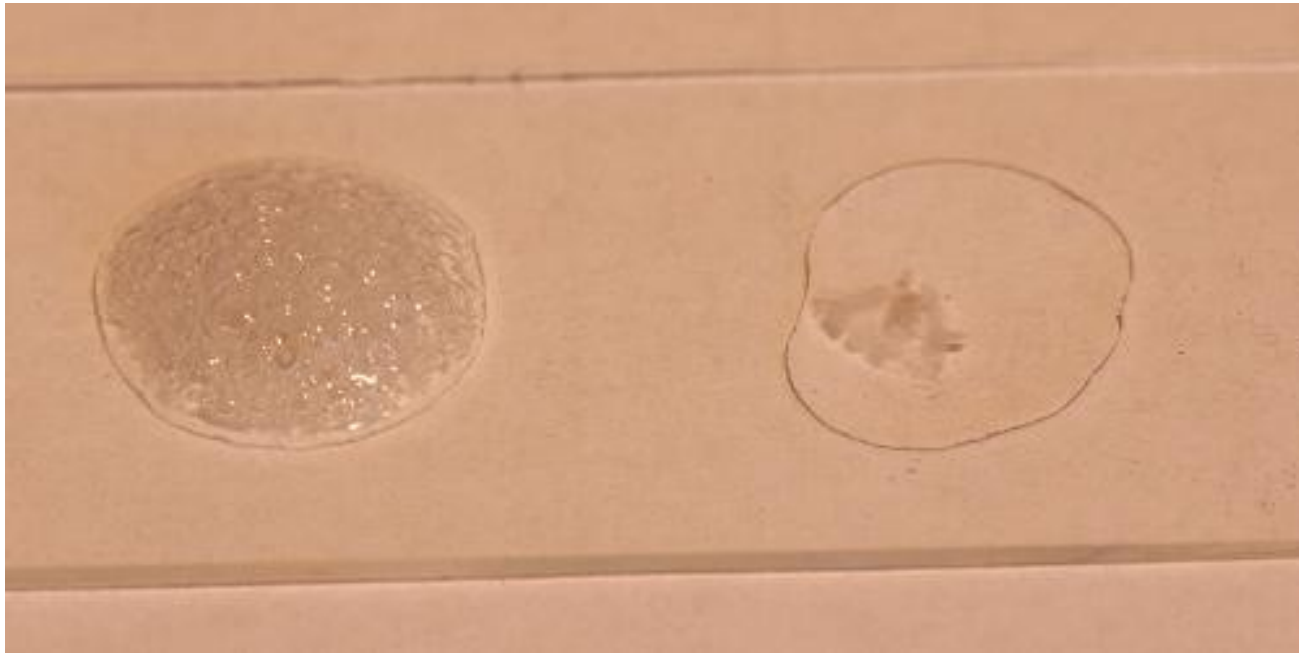
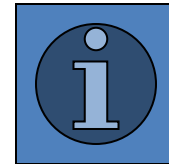
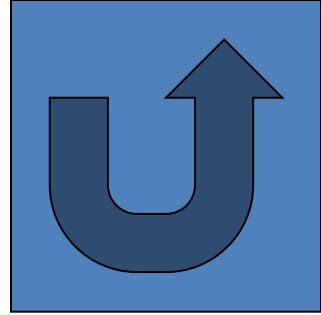


Foto:  
Veronika  
Holá

# Praktická poznámka



- Doporučený postup, jak provádět katalázový test, je: **na sklíčku vmíchejte trochu hmoty kmene do kapky roztoku peroxidu vodíku**
- Někteří mikrobiologové kapou peroxid přímo na kolonie. V případě krevního agaru je to riskantní – mikrobiolog musí být zkušený, aby odlišil opravdovou katalázovou reakci bakterií od slabé katalázové reakce červených krvinek
- V praxi to rozhodně nedělejte i z dalšího důvodu: peroxid bakterie usmrcuje, a na misce by nemuselo zůstat dost živých bakterií pro další studenty.

# Testy s diagnostickými proužky

- **Testy s dg. proužky** – Reakční ploškou se dotkneme kolonií. V případě positivity ploška změní barvu. Nejběžnější jsou tyto:



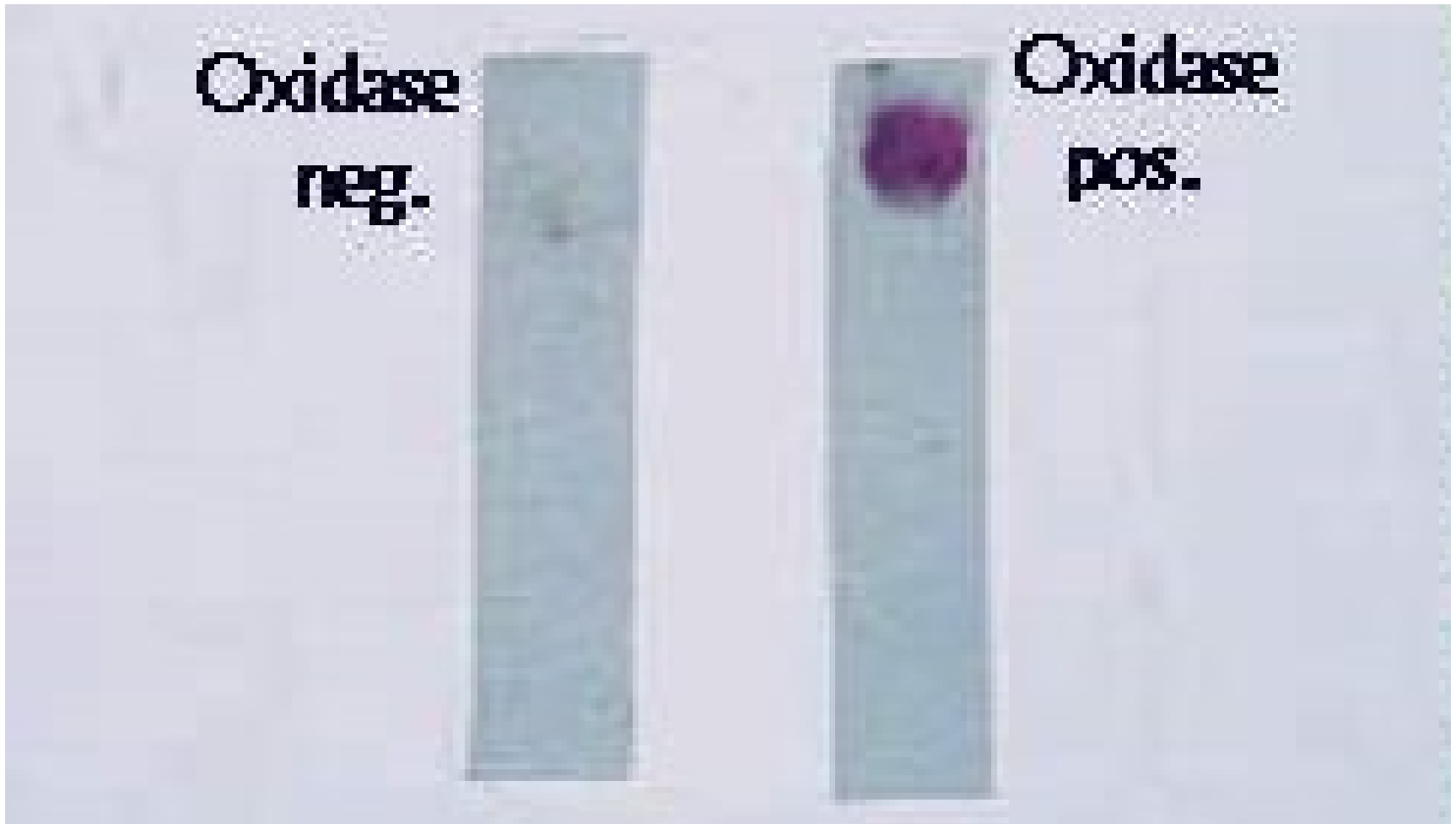
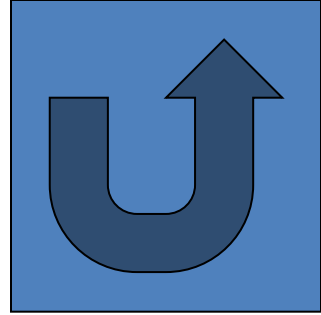
- **oxidáza** – reakční ploška **zmodrá** (nebo alespoň ta místa, kde jsme se dotkli kolonií). Pro příklady využití tohoto testu klikněte na „**i**“.
- **INAC** – reakční ploška po několika minutách **zmodrozelená**; proužek nutno před použitím navlhčit
- **PYR** – reakční ploška po několika minutách, přikápnutí činidla a další minutě čekání **zčervená**
- **betalaktamázový proužek** – týká se testování určitého faktoru rezistence na antibiotika (více v J06)

# Provedení testu v praxi



Foto: archiv MÚ

# Oxidázový test



# Jednoduché zkumavkové testy

- Mohou probíhat **v tekuté fázi, nebo v agaru**.
- V obou případech je **ve zkumavce substrát, případně také indikátor**. Příklady variant postupu jsou uvedeny na dalších obrazovkách



# Jednoduché zkumavkové testy – možnosti provedení

- 1) **Substrát je rozpuštěn v tekutině**, při testu do něj vmícháme kmen, po inkubaci sledujeme změnu zbarvení (v celém objemu, nebo jako prstenec u hladiny). **Příklad:** arabinózový test k rozlišení enterokoků (tekutina zůstane zelená = test negativní, *Enterococcus faecalis*; tekutina zežloutne = test pozitivní, *Enterococcus faecium*)

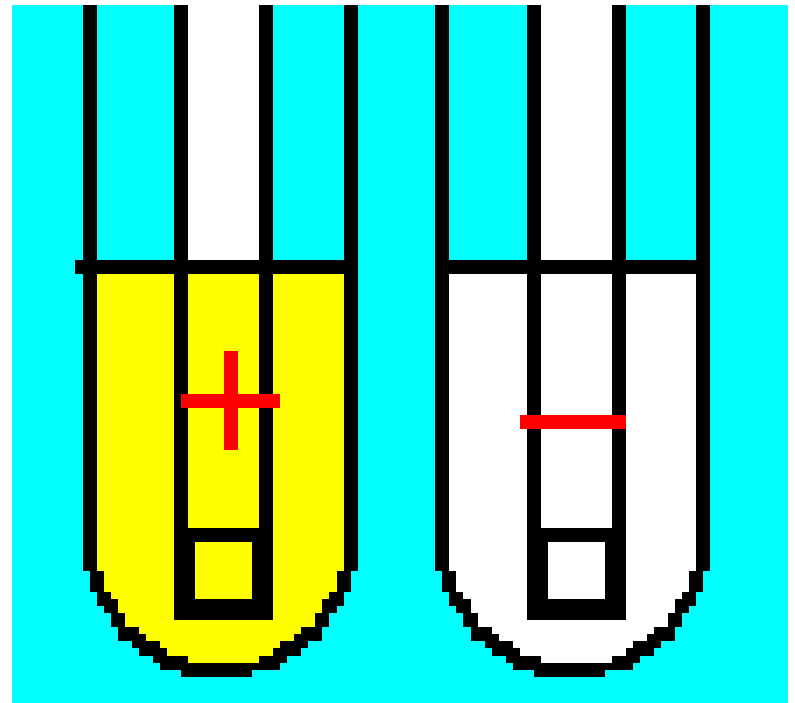
# Jednoduché zkumavkové testy – pokračování

- 2) Nejprve rozmícháme v tekutině (fyziologickém roztoku) kmen, pak **přidáme proužek (podobný např. oxidázovému) napuštěný substrátem.** Substrát se začne uvolňovat z reakční plošky  
**Příklad:** ONPG test (pozitivní = tekutina zežloutne, negativní = zůstane bezbarvá), VPT test (po přidání dvou různých činidel se v negativním případě nestane nic, v pozitivním se vytvoří červený prstenec u hladiny)

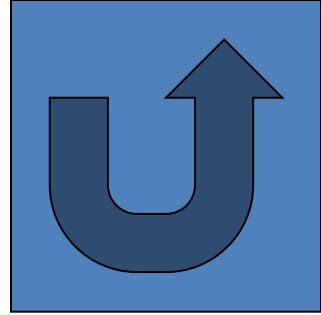
# ONPG

- **ONPG:** Příklad **jednoduchého zkumavkového testu**. Na proužku je přidán substrát. **Zežloutnutí tekutiny znamená pozitivitu testu.**

Příklad použití: rozlišení rodů *Citrobacter* (pozitivní) a *Salmonella* (negativní)



# Jednoduché zkumavkové testy – pokračování



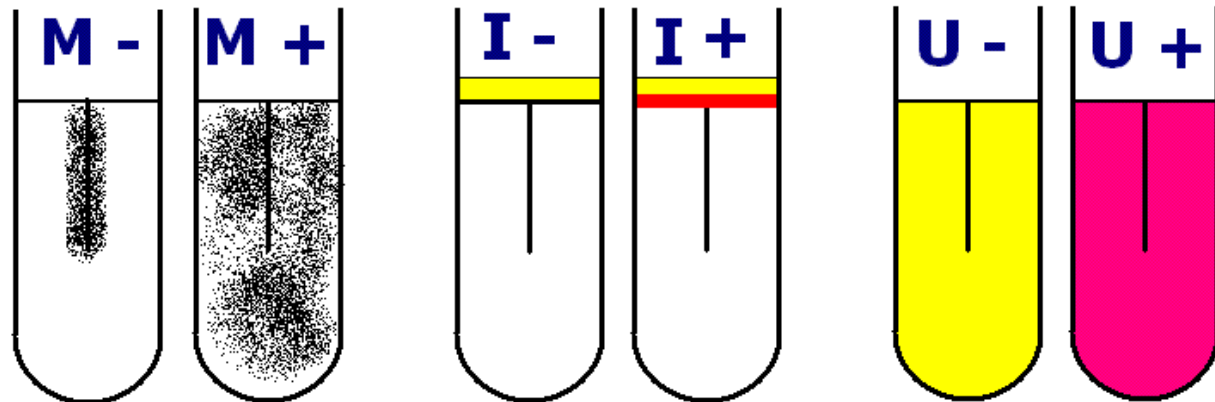
- 3) Je připraven agar obsahující substrát. Barva buď zůstane původní, nebo se změní.

Příklad: **Citrát dle Simmonse.**

Pokud zůstane půda zelená, je test negativní, pokud zmodrá, je pozitivní

# Složité zkumavkové testy

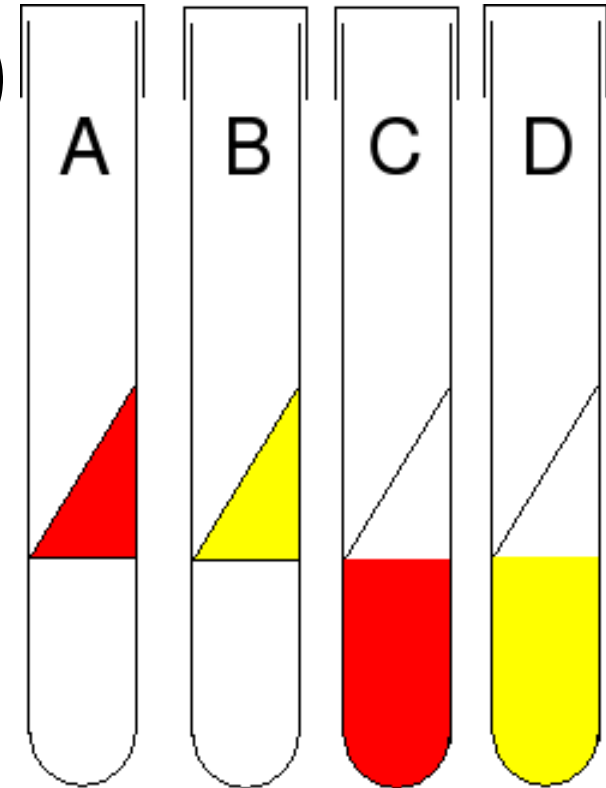
- V jedné zkumavce probíhá více reakcí
- Např. **test MIU**.
  - **M = motility** – pohyb (zákal se rozlézá polotekutým agarem, nezůstává jen v místě vpichu)
  - **I = indol** (pozitivita = červený prstenec)
  - **U = urea** (štěpení močoviny indikuje zrůžovnění celé půdy)



- Nebo **Hajnova půda**

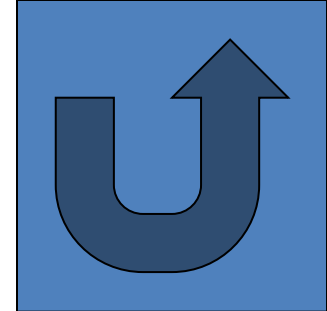
# Hajnova půda (*Kligler Iron Agar – KIA v Hajnově modifikaci*)

- **Červený vršek** – laktóza negativní
- **Žlutý vršek** – laktóza pozitivní
- **Červený spodek** – glukóza negativní
- **Žlutý spodek** – glukóza pozitivní
- **Černý spodek** – bakterie tvoří sirovodík (zakrývá pozitivní glukózu!)
- **Potrhání půdy či odsunutí nahoru** – bakterie tvoří plyny při fermentaci glukózy

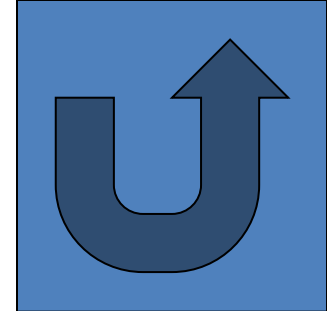


# Příklad vyhodnocení

## Hajna + MIU



Test	Hajna			MIU		
	Glc	Lac	H <sub>2</sub> S	Mot	Ind	Ure
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	(+)
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Salmonella enterica</i>	+	-	+	(+)	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	(+)	(+)	+	-	-



# Sady zkumavek

- Složité zkumavkové testy mají své nevýhody. Často při pozitivitě jednoho testu není vidět, zda je pozitivní test jiný. **Špatně se automatizují** a vyžadují dobře zaškoleného pracovníka
- Jednodušší, i když někdy dražší řešení, je **sada několika jednoduchých zkumavkových testů**
- *Lze ovšem i zkombinovat testy složité a jednoduché (např. Hajna + MIU + Simmons citrát + ornitin dekarboxyláza – v naší laboratoři)*



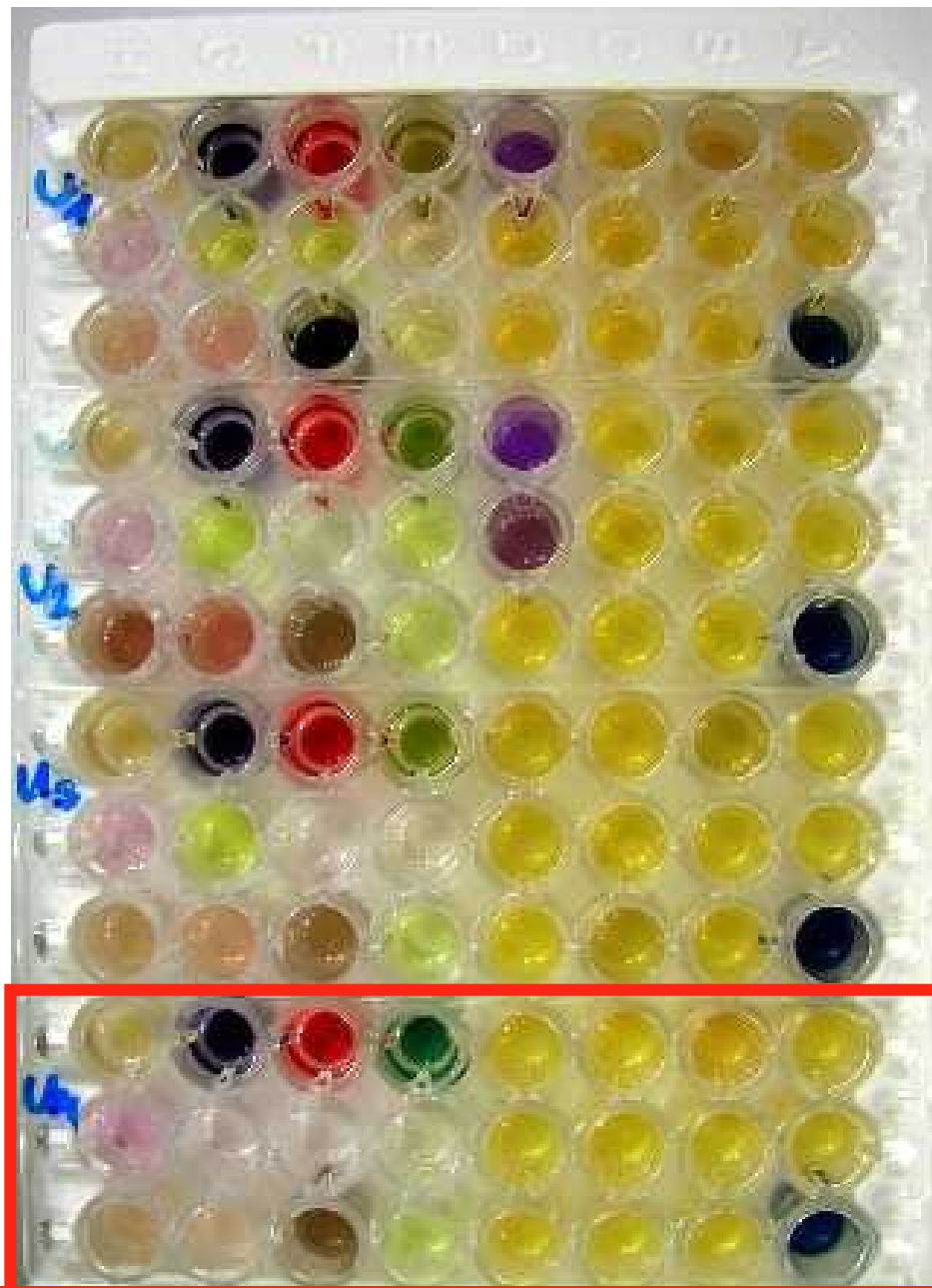
# Miniaturizace: testy v plastových panelech

- **Miniaturizace sady jednoduchých zkumavkových testů** → testy v důlcích plastových mikrotitračních destiček. Místo každé zkumavky je jeden důlek
- **Počet testů v sadách kolísá** od sedmi (Neisseria Test) až po více než padesát
- **Liší se v technických detailech.** Vždy je však substrát sušený, bakterie se nejprve rozmíchá ve FR nebo suspenzním médiu a pak se kape či lije do důlků

# Provedení testů od firmy Erba Lachema (u nás nejběžnější)

- Výrobce dodává destičky se **sušenými substráty, umístěnými na dně důlků v destičce**
- Pracovník připraví **suspenzi bakterie ve FR nebo v suspenzním médiu**
- Do každého důlku se kápne **kapka suspenze** či dvě kapky
- Zbytek suspenze se často ještě využije jako zkumavkový test s diagnostickým proužkem (ONPG, VPT)
- Destička i zkumavka se **inkubuje v termostatu**

NEFERMtest 24  
Erba Lachema:  
do jednoho rámečku  
lze vložit čtyři  
trojřádky (čtyři testy,  
určení čtyř různých  
kmenů)



# Vyhodnocení destičkových testů

- Z takového testu dostaneme **řadu výsledků** – většinou ve tvaru „+“ (test pozitivní, substrát štěpen, došlo ke změně) nebo „-“ (test negativní, substrát nebyl štěpen, zbarvení zůstalo původní).
- **Příklad:** + - + + + - - - - - + + + +
- Je několik způsobů, jak takovou řadu převést na „čitelný výsledek“

# Možné způsoby hodnocení

- **Porovnání s tabulkou** je možné jen u jednoduchých testů a jasných výsledků.
- Přepočet na **oktalové kódy** plus vyhledání výsledku v seznamu kódů. Nejběžněji používáno
- Výsledek se zadá **do počítače**, který „vyplivne“ vyhodnocení. Ne vždy praktické

*Počítačové hodnocení se používá hlavně tehdy, pokud už „čtení“ výsledku probíhá automaticky, např. na spektrofotometru.*

# Oktaľové kódy – co to je a proč

- Matematicky vzato je to vlastně **převedení dvojkové soustavy** (zápis  $++--++---$ , respektive 110011000) **do osmičkové** soustavy (zápis 630)
- Z praktických důvodů se zpravidla uvnitř trojice sčítá „opačně“ – normálně by při převodu z dvojkové do osmičkové či desítkové soustavy 1 1 0 měla být šestka a 0 1 1 trojka, v praxi to však z jistých důvodů počítáme většinou naopak

# Oktaľové kódy – II

- **V praxi se tedy každé trojici výsledků přiřadí číslice od nuly po sedmičku** – viz následující obrazovka
- Samozřejmě, pokud má test např. 17 reakcí, je na konci místo trojice jen dvojice, v tom případě číslice na konci může být jen 0, 1, 2, 3.
- Pokud by reakcí bylo 16 (19, 22...) bude na konci nula nebo jednička.

# Praktický příklad

- Zaznamenají se pozitivní a negativní výsledky reakcí
- Pod každou trojici se napíše 1 – 2 – 4
- Sečtou se pro každou trojici pouze číslice u „+“, nikoli u „–“ (ty se přeškrtnou)

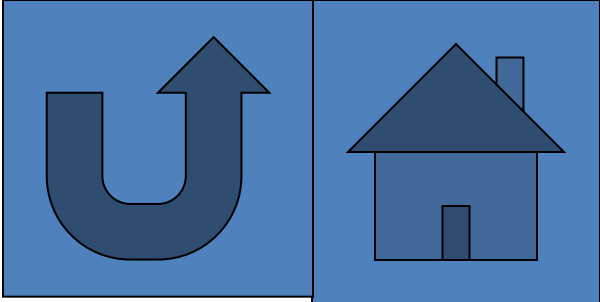
Test	JAN	LEN	MAG	TOM	PET	KAR	FRA	HAN
Výsl.	+	–	+	+	+	–	–	–
	1	<del>2</del>	4	1	2	<del>4</del>	<del>1</del>	<del>2</del>
Kód	5			3			0	



# Přepočítávání trojic

--- 1 2 4		<b>0</b>
+-- <b>1</b> 2 4	1	<b>1</b>
-+- 1 <b>2</b> 4	2	<b>2</b>
++- <b>1</b> <b>2</b> 4	1 + 2	<b>3</b>
--+ 1 2 <b>4</b>	4	<b>4</b>
+ - + <b>1</b> 2 <b>4</b>	1 + 4	<b>5</b>
- + + 1 <b>2</b> <b>4</b>	2 + 4	<b>6</b>
+ + + <b>1</b> <b>2</b> <b>4</b>	1 + 2 + 4	<b>7</b>

# Konkrétně u ENTEROtestu16 (17 testů)



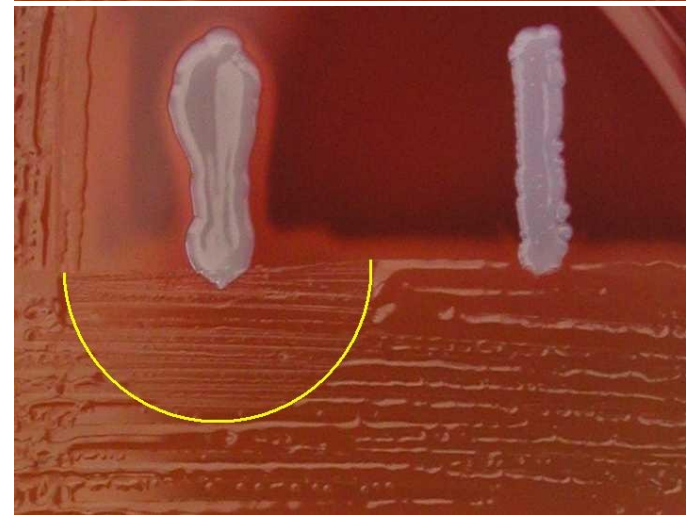
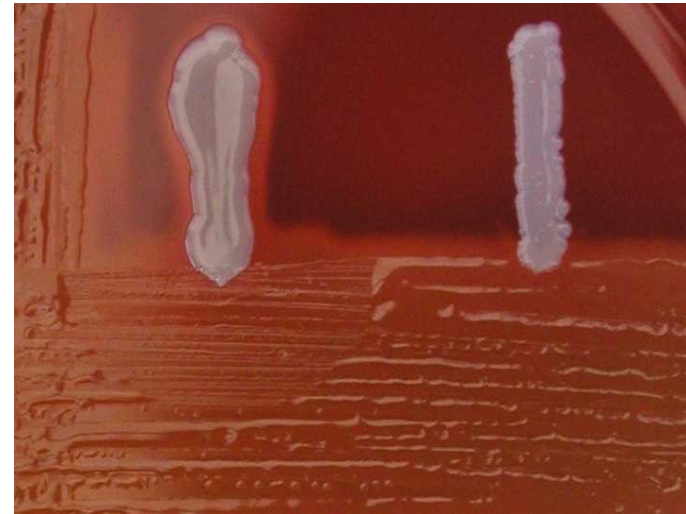
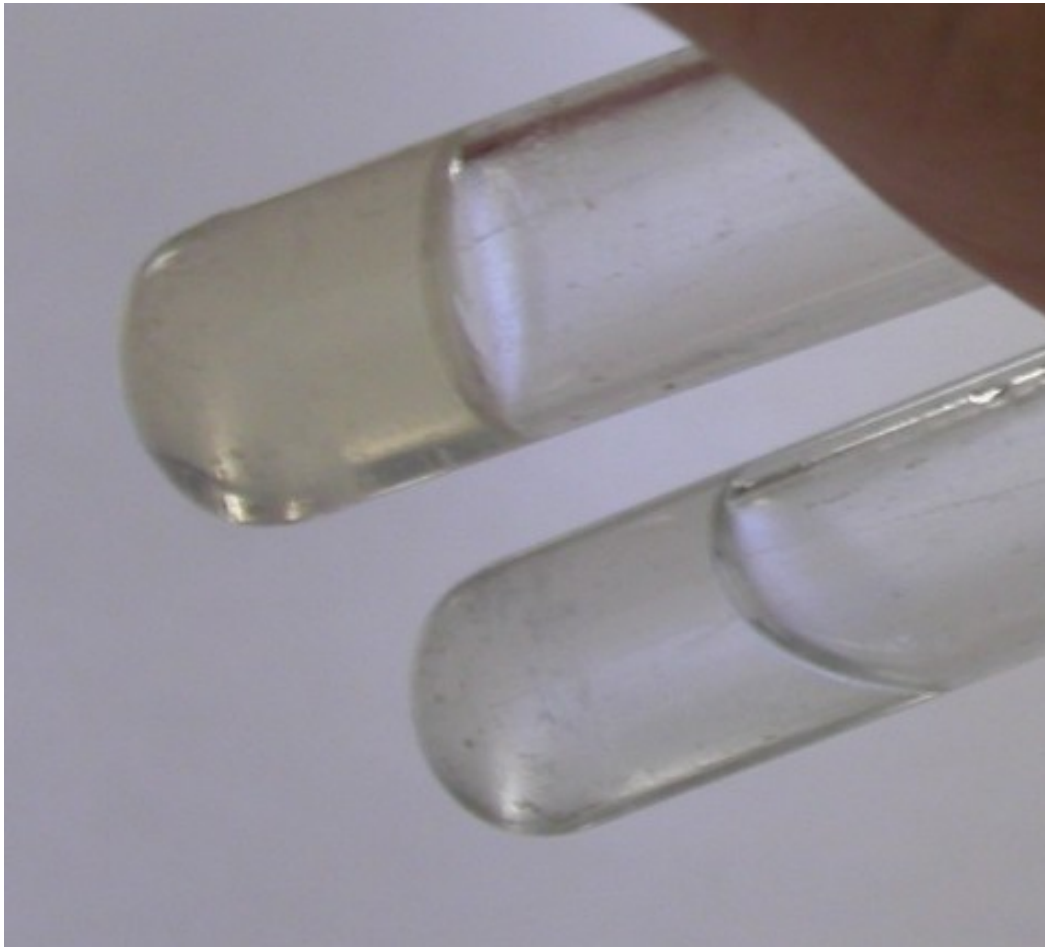
ONPG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	
	První řádek panelu								Druhý řádek panelu								
+																	
-																	
?																	
?	+	<del>-</del>	+	+	+	<del>-</del>	<del>-</del>	<del>-</del>	<del>-</del>	<del>-</del>	<del>-</del>	<del>-</del>	<del>-</del>	+	+	+	+
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	5			3			0			0			6			3	

Identifikační  
metody – jiné  
než  
substrátové

# Jiné identifikační testy

- Kromě testů založených přímo na štěpení substrátu, existují i **jiné podobné testy**, které zkoumají vybavení bakterií určitými enzymy či faktory virulence. Například:
  - Test schopnosti koagulovat králičí plasmu
  - Test schopnosti aglutinovat králičí plasmu
  - Test schopnosti „odpouzdřit“ opouzdřený kmen (hyaluronidázový test)
  - Testování pohyblivosti, to už jsme měli

# Plasmakoaguláza a hyaluronidáza (oba testy se užívají u stafylokoků)





# Diagnostické použití antibiotik

- Jednou z možností je také **testování in vitro citlivosti na určité antibiotikum** v případě, že víme, že kmen X je vždy citlivý a kmen Y je vždy rezistentní. I zde ovšem nemusí jít o 100 %, ale např. 95 %. Používají se i taková antibiotika, která neslouží k léčbě, případně se používala dříve, ale v současnosti již se nepoužívají.
- Příkladem je třeba **optochinový test z minulého praktika**
- **Praktické provedení je stejné jako u testů citlivosti na antibiotika, ale zpravidla se neměří zóna (pouze se konstatuje její existence)**

Novinky  
v identifikační  
ch metodách

# Nové identifikační metody

- Jedním z trendů poslední doby je **automatizace biochemické identifikace** při zapojení expertního systému. V některých případech identifikace přímo navazuje na (automatickou) kultivaci kmene
- **Problémem** při použití těchto metod je, že zpravidla není dostatečně zohledněn klinický původ kmene, a tím vhodná míra přesnosti identifikace, výběr pravděpodobného patogena × náhodně kontaminujícího kmene apod.
- Jinou možností jsou nové metody na jiném principu, například **hmotová spektrometrie** typu MALDI-TOF, viz dále



# MALDI TOF

- Princip: hmotová spektrometrie
  - již dávno využíváno v chemii, ale **klasické způsoby umožňovaly analyzovat látky jen s nízkou molekulovou hmotností**
  - založena na **rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností**
  - nyní **díky ionizaci laserovými paprsky lze detekovat i velké molekuly**, charakteristické pro jednotlivé druhy bakterií či kvasinek
  - využívá **ionizaci laserem za přítomnosti matrice** (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight)
- Navzdory vysoké ekonomické náročnosti (řádově miliony Kč) jsou postupně jednotlivé laboratoře touto metodou vybavovány

# MALDI TOF – detaily

- rychlost částice (nepřímo úměrnou její hmotnosti) lze vypočítat z **doby průletu, změřené detektorem (TOF)**
- směs matrice (např. kyseliny 4-hydroxy-skořicové) a kmene na nerezové destičce je zasažena **nanosekundovým pulsem laseru**
- matrice absorbuje energii pulsu a molekuly vzorku jsou **ionizovány jejím rozkladem**
- metoda u kmene „nalezne“ **specifické bílkoviny a porovná je s databází**, dnes již poměrně širokou, ale stále rozšiřovanou

# MALDI-TOF

Přejít na webové stránky výrobce





# Práce s MALDI-TOF



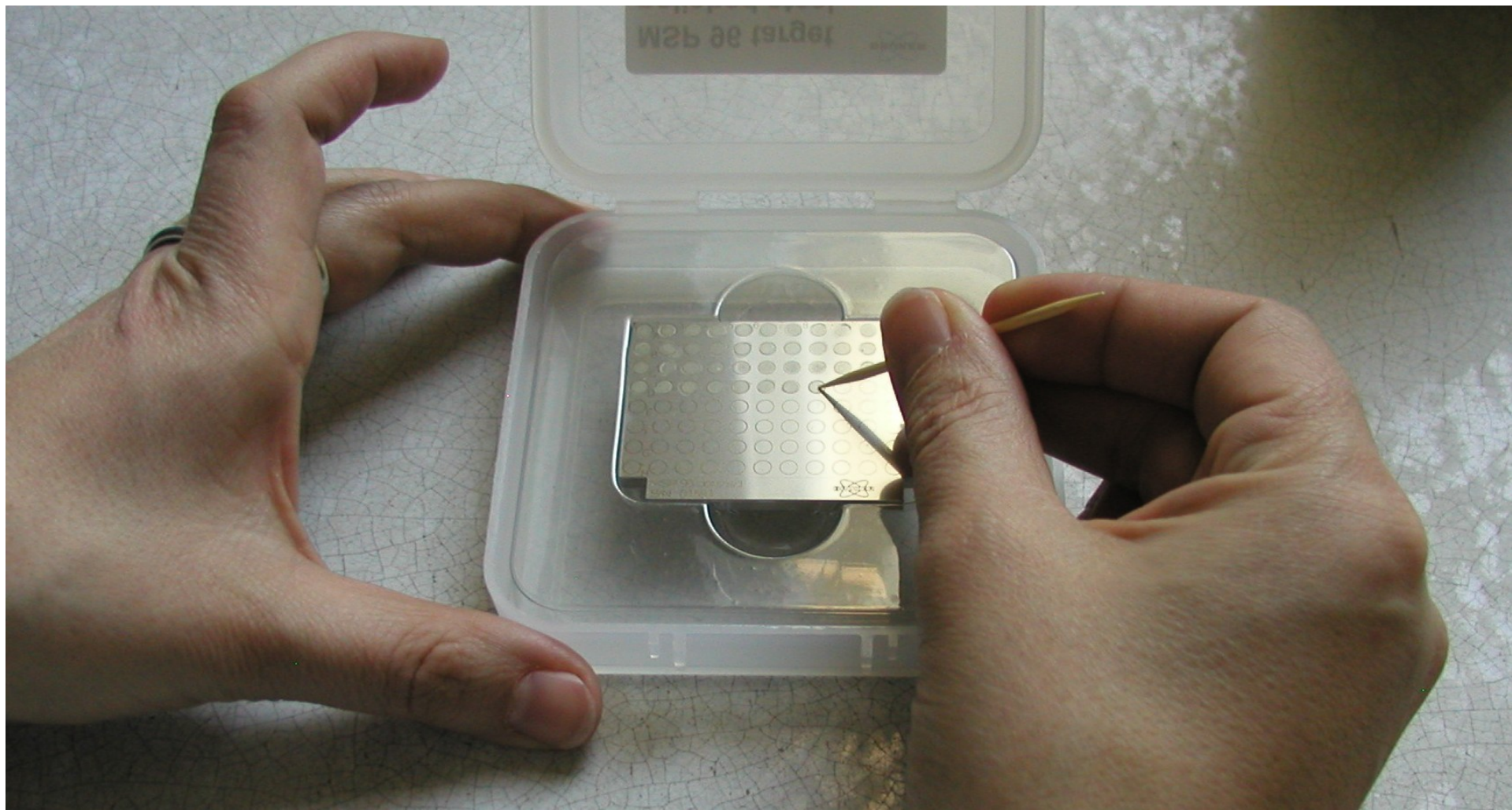
Biomer  
Biomer  
Classification Results

Sample	Mass	Abundance	Reference
Sample 1	1000	100	Reference 1
Sample 2	1000	100	Reference 1
Sample 3	1000	100	Reference 1
Sample 4	1000	100	Reference 1
Sample 5	1000	100	Reference 1
Sample 6	1000	100	Reference 1
Sample 7	1000	100	Reference 1
Sample 8	1000	100	Reference 1
Sample 9	1000	100	Reference 1
Sample 10	1000	100	Reference 1

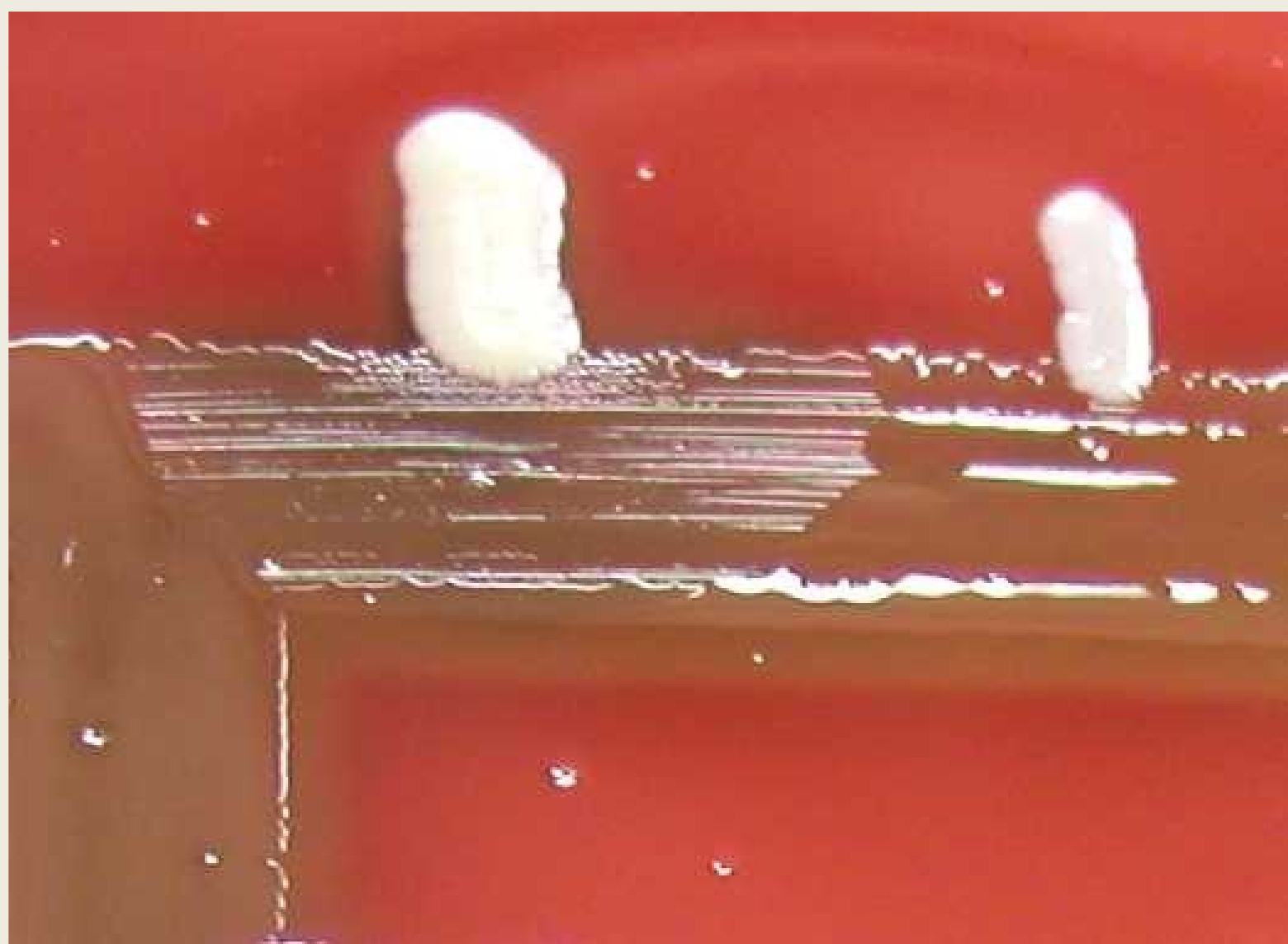
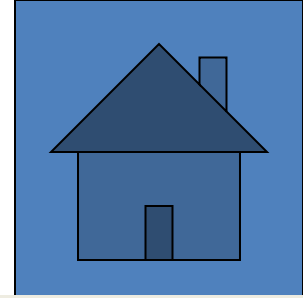
Biomer  
Eppendorf



# Příprava kmene pro MALDI-TOF

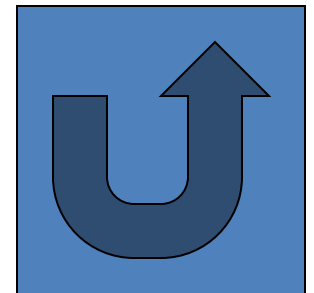


# Konec této části



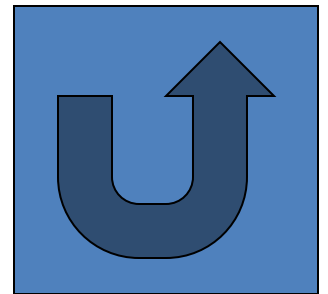
# Příklady použití katalázového testu

- Nejčastější je použití při diagnostice **G+ koků**.  
Z lékařsky významných rodů jsou stafylokoky kataláza +, zatímco stafylokoky a enterokoky kataláza –
- Nicméně jsou i jiné příklady, například u **G+ tyčinek**: *Listeria* je kataláza +, *Erysipelothrix* (mikroskopicky podobná) kataláza –

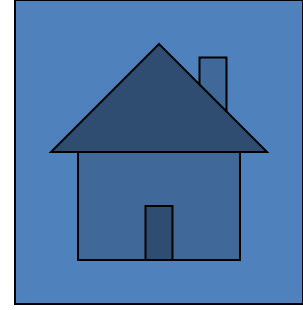


# Příklady využití oxidázového testu

- Oxidázu lze využít v různých situacích:
- Potvrdit určení rodů *Neisseria*, *Moraxella* a *Pseudomonas* (oxidáza pozitivní)
- Rozlišit mezi *Vibrionaceae* (oxidáza +) a *Enterobacteriaceae* (oxidáza – s výjimkou rodu *Plesiomonas*)







# Kontrolní otázky k této části

Vyhledejte odpovědi a pak v ISu vyplňte

**Odpovědník. Znění otázky v Odpovědníku nemusí být zcela identické jako zde.**

1. Co znamená zkratka "MIU"?
2. Proč nám ani při rozlišení dvou druhů nemusí stačit jediný test?
3. Jak se používá oxidázový proužek?
4. Jaký je viditelný rozdíl mezi produkty a substrátem v katalázové reakci?
5. Vyjadřuje procento pravděpodobnosti identifikace totéž jako index typičnosti?
6. Když na určité půdě kultivujeme bakterie, získáme informaci, zda fermentují laktózu. Jak se tato půda jmenuje?
7. Kdy není při biochemické identifikační reakci potřeba indikátor?
8. Znamená každé využití cukru jeho fermentativní rozštěpení?
9. Je možné, aby jeden druh organismu byl schopen štěpit určitý substrát, a jiný ne?
10. A ještě nějaká překvapení navíc 😊

*Zpět na hlavní obsah*

**ENTEROKOKY**

**A G+ TYČINKY**

# Přehled G+ bakterií

Příběh	Tvar	V policejní kartotéce vedeni jako
P01	Lékařsky významné Koky	Stafylokoky ( <i>S. aureus</i> , koag. neg. st.)
P02		Streptokoky (viridující, hemolytické)
1.		Enterokoky ( <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> )
2.	Lékařsky významné Tyčky	Listerie (typicky <i>L. monocytogenes</i> )
3.		Korynebakteria
4.		Bacily

*Listerie a korynebakteria nesporulují, bacily sporulují*

# Obsah

Klinická charakteristika – enterokoky

Klinická charakteristika – G+ tyčinky

Léčba infekcí způsobených enterokoky a G+ tyčinkami

Diagnostika enterokoků a G+ tyčinek (+ obrázky)

Diferenciální diagnostika enterokoků a G+ tyčinek

*Zpět na hlavní obsah*

# Klinická charakteristika - enterokoky

# Příběh první

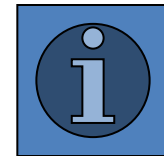
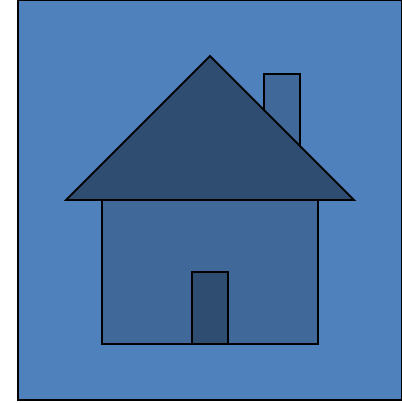
- L. si stěžovala mamince na bolesti při močení a maminka si všimla, že chodí na záchod hodně často. Lékař na středisku jí předepsal Zinnat, ale potíže se nezlepšily. Při další návštěvě ji tedy nechal vymočit do „šampusky“ a moč poslal na mikrobiologii. Přišlo mu ale, že výsledek nelze hodnotit, neboť moč je kontaminovaná. Nakonec se přece jen podařilo moč odebrat asepticky a podle výsledku změnit terapii.

# Pátráme po pachateli

- Vinen je ***Enterococcus faecalis***
- Jak napovídá rodové i druhové jméno, je to mikrob normálně se vyskytující ve střevě. Je ale také jedním z nejběžnějších původců močových infekcí
- Viníkem je ovšem i lékař – předepsal antibiotika bez kultivace moče; bohužel, enterokoky jsou na všechna cefalosporinová antibiotika primárně rezistentní. Navíc podcenil aseptický odběr moče.
- *IMC (infekce močových cest) jsou převážně bakteriální. Navíc původci mívají řadu primárních i sekundárních rezistencí. Proto lze vřele doporučit mikrobiologické vyšetření moče, i když v praxi se často zapomene provést.*

# Více o enterokokách

- Dnes jich rozeznáváme **desítky druhů**
- Všechny mohou být nalézány
  - **ve stolici** (jako normální mikroflóra)
  - **v močovém měchýři** (jako patogeny)
  - **v pochvě** (asymptomaticky nebo symptomaticky)
  - občas i **jinde** (rány, krevní řečiště)
- Ze dvou nejběžnějších druhů *E. faecalis* bývá o něco častěji patogenem, *E. faecium* je častěji součástí střevní mikroflóry
- Nebezpečné jsou **vankomycin rezistentní enterokoky (VRE)**
- Jeden z enterokoků, nalezený v Brně, má název *Enterococcus moraviensis*





# Klinická charakteristika G+ tyčinky

# Příběh druhý

- Evropský komisař zachmuřeně hleděl na kupu stížností. Francouzští zemědělci protestují proti několika státům EU, které brání dovozu **delikatesních francouzských sýrů** na jejich území.
- Německé úřady zákaz dovozu zdůvodňují tím, že těhotná paní H. M. po požití sýra pozorovala **zvýšenou teplotu** a nakonec její dítě trpělo **novorozeneckou meningitidou**, pro kterou muselo být komplikovaně léčeno.

# Kdo za to tentokrát může?

- Bakterie *Listeria monocytogenes* je grampozitivní tyčinka, která se vyznačuje schopností růst při nízkých teplotách a vysokých koncentracích NaCl, což je oboje splněno např. ve skladech sýrů. Lidé se ale nakazí i požitím dalších potravin (saláty, uzeniny, lahůdkové výrobky, nedostatečně omytá zelenina)

# Listerie – pokračování

- Málokdy vyvolává viditelné infekce dospělých. U těhotných ale hrozí kongenitální infekce plodu přes placentu s následkem potratu nebo (ve třetím trimestru) infekce plodu, nebo také perinatální infekce při porodu (nákaza kontaminovaným poševním sekretem). U novorozenců je typická meningitida či seps
- Infekce není příliš častá, má však vysokou smrtnost (letalitu, tj. procento úmrtí ze všech nakažených)
- Někdy se stává záminkou pro omezení dovozu – vždy by se mělo zvážit konkrétní riziko v individuálním případě

# Příběh třetí

- Pan B. je diabetik, chronický pacient, nyní léčen pro **bércové vředy**. Bohužel, infekce střídá infekci. Před půlrokem byla usvědčena *Escherichia coli*, před dvěma měsíci zase *Enterococcus faecium*, blízký příbuzný enterokoka *Enterococcus faecalis*. Lékaři jsou zvědaví, co se z bércového vředu pana B. vykultivuje tentokrát.

# A už to vědí: viníkem je nyní

- *Corynebacterium jeikeium*, relativně nejobávanější ze skupiny tzv. nedifterických (= nezáškrtových) korynebakterií. Původně se mu říkalo „korynebakterium skupiny JK“.
- Korynebakteria jsou grampozitivní tyčinky, někdy pleomorfní (různotvaré), často uspořádané do palisád (vizte dále)
- Do stejného rodu patří i původce záškrtu, dnes díky očkování u nás vzácný – *C. diphtheriae*.
- Název je odvozen od kyjovitého tvaru (koryné = kyj), ovšem tato morfologie je typická spíše pro *C. diphthteria* než pro nedifterická korynebakteria

# Co ještě vědět o nedifterických korynebakteriích

- Jsou normální součástí běžné flóry na kůži, spolu se stafylokoky a kvasinkami
- V mikroskopii se vyznačují palisádovým uspořádáním – název dle raně středověkého kúlového opevnění

File:St Fagans Celtic village palisade.jpg, From Wikipedia, the free encyclopedia, available at [http://en.wikipedia.org/wiki/File:St\\_Fagans\\_Celtic\\_village\\_palisade.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:St_Fagans_Celtic_village_palisade.jpg), visited 2012-10-02



# Co jsou to „koryneformní tyčinky“

- „Koryneformní tyčinky“ (případně „diftheroidy“) jsou **různé tyčinky s podobnou morfologií** (i když jejich rozměry se mohou poměrně lišit).
- Všechny jsou občasnými původci různých typů lidských infekcí.
- *Arcanobacterium haemolyticum* je vzácným původcem faryngitid
- Další rody: *Dermatophilus*, *Rhodococcus*\*, *Turicella* atd.
- Podobná je i *Erysipelothrix rhusiopathiae* – původce zoonózy zvané erysipeloid (u zvířat červenka)

*Rhodococcus jostii* byl nalezen na mrtvém těle moravského markraběte a nekorunovaného římského císaře Jodoka (Jošta) zemřevšího 1411. Tělo je pohřbeno v kostele sv. Tomáše v Brně



# Příběh čtvrtý

- Sestřička Blaženka se zděsila: přišly výsledky stěrů z nemocničních lůžek, které před týdnem odebírali pracovníci nemocniční epidemiologie. A skoro v polovině stěrů se našly nějaké bakterie, dokonce **BACILY!** No ano, tady to je – *Bacillus* sp. Sestřička Blaženka, chudinka ubohá, se celou noc trápila a špatně spala. Ráno zavolala na mikrobiologii a ptala se, cože je to za bakterii...

# Mlýnský kámen spadl z dobrého srdíčka sestry Blaženky

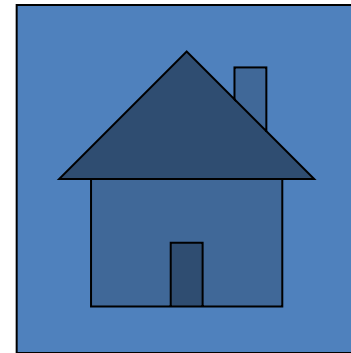
- když se dozvěděla, že většina příslušníků rodu *Bacillus* jsou **neškodné mikroby, vyskytující se ve vnějším prostředí**. Pokud se vyskytnou v kultivaci klinického vzorku, jde pravděpodobně o kontaminaci. Bacily tedy nejsou ve stěrech z lůžka závažným nálezem. Problém by byl jen tehdy, pokud by byly prokázány ve stěru z plochy, která má být sterilní (např. operační pole po dezinfekci)

# Jsou však i bacily stojící za zmínku

- *Bacillus anthracis* je původcem veterinárního onemocnění – uhláku (sněť slezinná). Byla to jedna z prvních nákaz, proti nimž byla zkoušena (již Pasteurem) vakcinace. Jeho spory jsou zneužitelné pro účely biologické války či bioterorismu (o úniku spor z tajné továrny v SSSR v roce 1979 viz: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Sverdlovsk%C3%BD\\_incident](http://cs.wikipedia.org/wiki/Sverdlovsk%C3%BD_incident))
- *Bacillus cereus* je původcem alimentárních intoxikací z obilných produktů.
- *Geobacillus* (dříve *Bacillus*) *stearothermophilus* a *Bacillus subtilis* se vzhledem ke své schopnosti přežít při velmi vysokých teplotách používají jako indikátory účinnosti sterilizátorů

# *Bacillus* a jeho spory

Spory *Bacillus* sp. jen někdy vyklenují (bubří) tyčinku (vegetativní buňku, která je obklopuje); mohou být terminální, subterminální či centrální

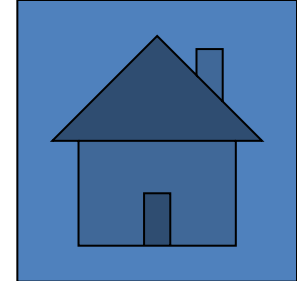


# Enterokoky a G+ tyčinky: léčba

# 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 hematoonkologických pacientů objevují epidemiologicky závažné **vankomycin rezistentní kmeny – VRE**. Zde zabírá pouze nové antibiotikum – **linezolid**

# Referenční zóny pro nejběžnější antibiotika



Enterokoky testujeme na MH, G+ tyčinky na MH s krvinkami.

Antibiotikum	Zkr.	„C“ je-li $\geq$ než (mm)	„I“ je-li mezi (mm)	„R“ je-li $<$ než (mm)
Ampicilin (aminopenicilin)	AMP	$\geq 10$	8–9	$< 8$
Nitrofurantoin (nitrofuran)	F	$\geq 15$	<del>8–9</del>	$< 15$
Vankomycin (glykopeptid)	VA	$\geq 12$	<del>8–9</del>	$< 12$
Tetracyklin*	TE	$\geq 19$	15–18	$< 15$
Quinu-/dalfopristin**	QD	$\geq 22$	20–22	$< 20$
Gentamicin (aminoglykosid)***	CN	$\geq 8$	<del>8–9</del>	$< 8$

\*platí i pro doxycyklin \*\*směs dvou streptograminů \*\*\*jen do kombinace s betalaktamy

# Diagnostika enterokoků a G+ tyčinek (+ obrázky)



# Popis pachatelů (diagnostika) – 1

	Enterokok	Listerie	Koryneform.	Bacillus
Mikroskopie	G+ koky v krátkých řetězcích	G+ tyčinky řetězí se za sebou nebo jako palisády	G+ tyčinky skládající se vedle sebe (palisády)	G+ robustní tyčinky, sporulující (nemusí být viditelné)
Kultivace	šedavé, velké asi jako <i>Str. agalactiae</i> , většinou bez hemolýzy, ale i s virid. či h.	podobné enterokokům, hemolýza je či není	velmi drobné kolonie podobné mouce	plst'ovité kolonie, někdy i výrazná hemolýza

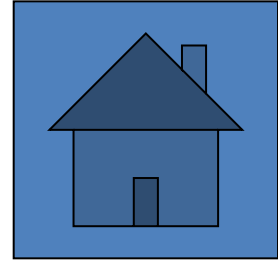
# Popis pachatelů (diagnostika) – 2

## Enterokoky

- **Biochemické testy:** kataláza negativní, možné je biochemické rozlišení, důležité štěpení arabinózy (*E. faecalis* neštěpí, půda je zelená, *E. faecium* štěpí, žloutne)
- **Antigenní analýza** se zpravidla nepoužívá. V dobách, kdy patřily mezi streptokoky, je Lancefieldová zařadila do antigenní skupiny D (*ovšem některé streptokoky ze skupiny D zůstaly v původním rodu*)
- **Citlivost** lze testovat na běžném MH agaru. Existují i půdy na skríníng VRE (viz dále)

# Popis pachatelů (diagnostika) – 3

## G+ tyčinky



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

# Diferenciální diagnostika enterokoků a G+ tyčinek

# Diferenciální diagnostika: enterokoky

- Gramovo barvení rozliší grampozitivní koky, grampozitivní tyčinky a ostatní bakterie.
- Stafylokoky odliší pozitivní kataláza a růst na NaCl
- Streptokoky odliší nepřítomnost růstu na Slanetz-Bartleyho či ŽE půdě, popř. PYR testem (kromě *S. pyogenes* negativní)
- Vzájemné rozlišení je možné arabinózovým testem nebo složitějším (ENCOCCUS) testem

# Rozlišení enterokoků



- Provedení arabinóзовého testu: kolonie se smísily s arabinózou a indikátorem a nechají inkubovat

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

- ENCOCCUS test má jen osm reakcí. Jinak se s ním pracuje podobně jako s jinými obdobnými testy

# Diferenciální diagnostika: *Bacillus*

- Gramovo barvení odliší grampozitivní tyčinky od ostatních
- Bacily se navíc projeví už v Gramově barvení coby velmi rozměrné (robustní) tyčinky. Často, ale ne vždy, můžeme také pozorovat tvorbu endospor (prázdná místa v tyčince)
- Kultivačně jsou také charakteristické (velké, plstovité 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 odliší grampozitivní tyčinky od ostatních
- Pokud tyčinky nesporulují a nejsou robustní, mělo by jít o listerie nebo některou z koryneformních tyčinek (pozor, samotná nepřítomnost endospory není důkaz!) Další rozlišení je možné biochemicky, růstem při různých teplotách, testy hemolytických interakcí (synergismů, antagonismů) apod.

*U G+ tyčinek ale není jednoznačný algoritmus!*



# Růst listerií 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.)

# Chromogenní půda na listerie

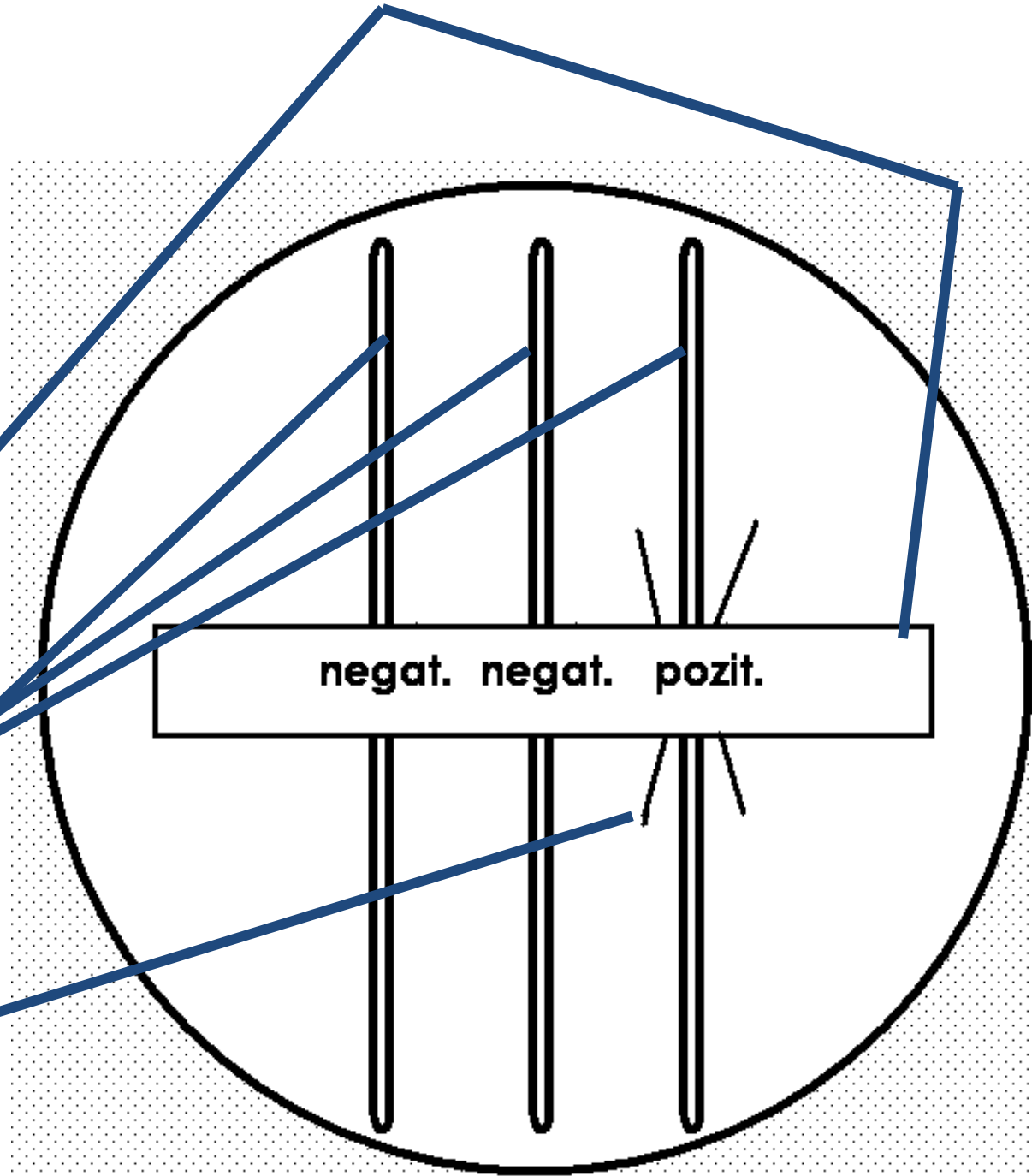
www.oxid.com



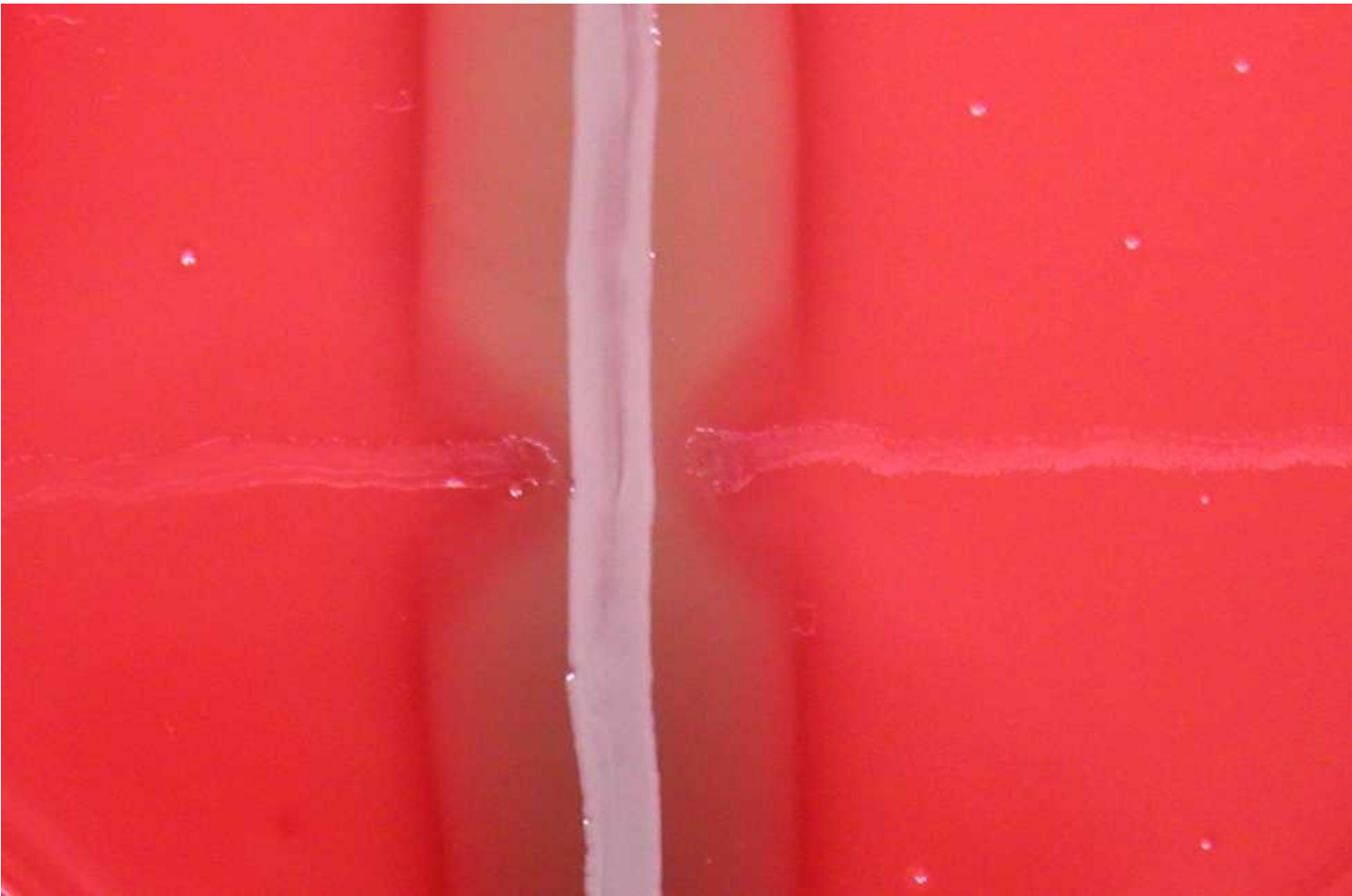
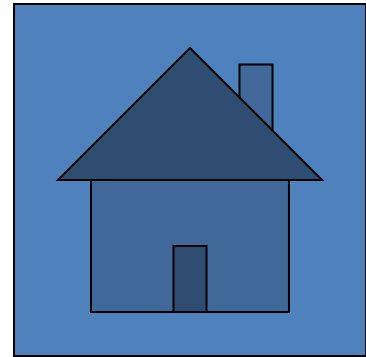
Existují různé chromogenní půdy k diagnostice listerií. Ta, která je na obrázku, se jmenuje ALOA a vyznačuje se modrým zbarvením všech kolonií listerií, přičemž patogenní druhy navíc mají kolem sebe halo (odlišně zbarvené okolí kolonie).

# 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.

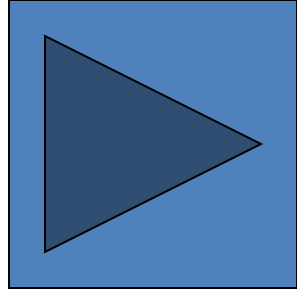


# Konec



Hemolytický antagonismus („reverzní CAMP test“) u *Arcanobacterium haemolyticum*

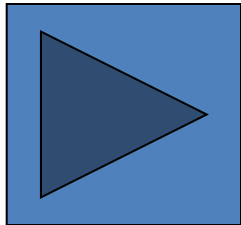
*Zpět na hlavní obsah*



Bonus: VRE (vankomycin  
rezistentní enterokoky)

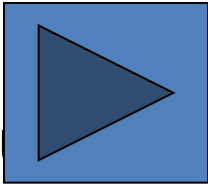
# Enterokoky – charakteristika citlivosti

- Enterokoky jsou **primárně rezistentní na řadu antibiotik** (mimo jiné všechny cefalosporiny, ale také makrolidy, linkosamidy, horší je i účinnost G-penicilinu)
- ***Enterococcus faecium*** (méně patogenní, ale více rezistentní než *E. faecalis*) je navíc **primárně rezistentní na ampicilin**
- K léčbě lze použít např. ko-trimoxazol, tetracykliny, chinolony, glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin); aminoglykosidy pouze v kombinaci

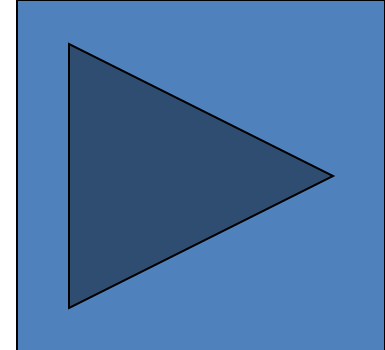


# VRE – kdy jsou závažné, a proč

- Rezistence na vankomycin jsou závažné u **klinicky významných izolátů druhů *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium***
- Pokud je zachyceno pouhé **nosičství VRE**, není to důvod k léčbě (enterokok je normální flórou střeva), avšak je to důvod k obezřetnosti a izolaci pacienta
- Z tohoto důvodu se u pacientů ARO často provádí **screening střevního nosičství VRE**
- Za závažnou se nepovažuje rezistence na vankomycin kmenů *E. gallinarum* či *E. casseliflavus*, izolace se nepovažuje za nutnou (druhy s menší patogenitou)
- Významnou hrozbou je **přenos rezistence na stafylokoky**, viz dále. I to je důvod, proč VRE hlídat a kontrolovat



# VRE v Brně



- Na MÚ LF MU a FN USA Brno byly donedávna zaznamenány pouze ojedinělé případy VRE, ale v posledních letech jich výrazně přibylo
- Naproti tomu na OKM FN Brno-Bohunice byly nálezy VRE už dříve podstatně častější
- Pravděpodobným důvodem je spektrum pacientů. VRE jsou časté u pacientů s nádorovým bujením leukocytárních buněk, a tito pacienti se v rámci JMK soustřeďují právě v bohunické nemocnici



Lékem volby je linezolid (ZYVOXID),  
případně dalfopristin/quinupristin  
(SYNERCID)

*Zpět na hlavní obsah*

