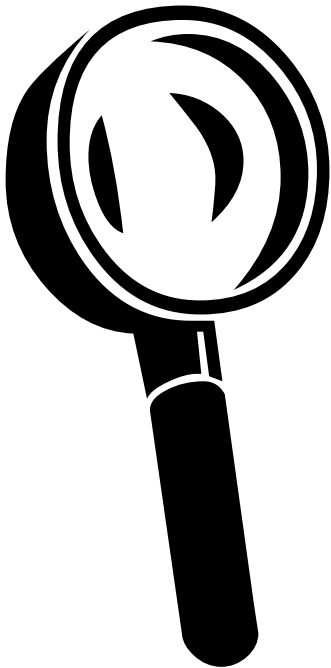


Mikrobiologický ústav uvádí
NA STOPĚ PACHATELE

Díl třetí:

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



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

Hlavní obsah

Identifikační metody

Enterokoky a G+ tyčinky

Enterokoky – bonus

IDENTIFI- KAČNÍ METODY

Přehled částí této 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
 - **Biochemická identifikace – 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

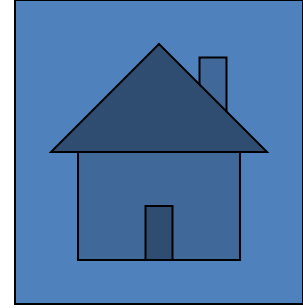
- Bakterie mají svůj **specifický metabolismus**
- **Průmyslová mikrobiologie** využívá bakteriálního metabolismu (zejména fermentativního katabolismu) k výrobě různých látek, včetně řady potravin
- **Klinická mikrobiologie** využívá vzájemných rozdílů v metabolismu mezi bakteriemi k jejich vzájemnému 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

Pro připomenutí...



Jestlipak víte, že jste se s takovým biochemickým testem už vlastně setkali? Že ne? Ale ano, u kultivace.

ENDOVA PŮDA

*v sobě 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-positivní 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)**

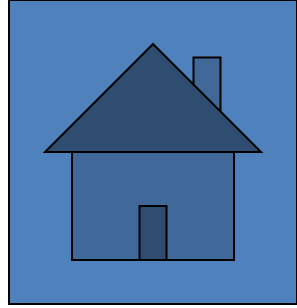
Pravděpodobnost výsledku

- 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

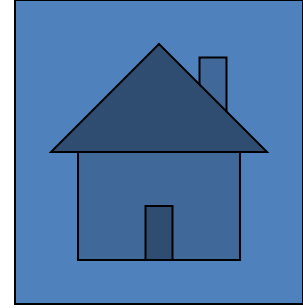
Příklady



- **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

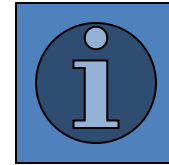
– Jiné testy (např. Švejcárova plotna)

Katalázový test

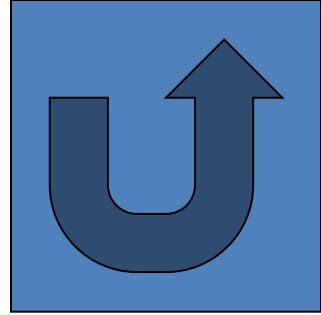
- **Katalázový test:** velmi jednoduchý, do substrátu (roztok H_2O_2) rozmícháme bakterie. Bublinky = pozitivita.

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

- Konkrétní příklady použití tohoto testu



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:



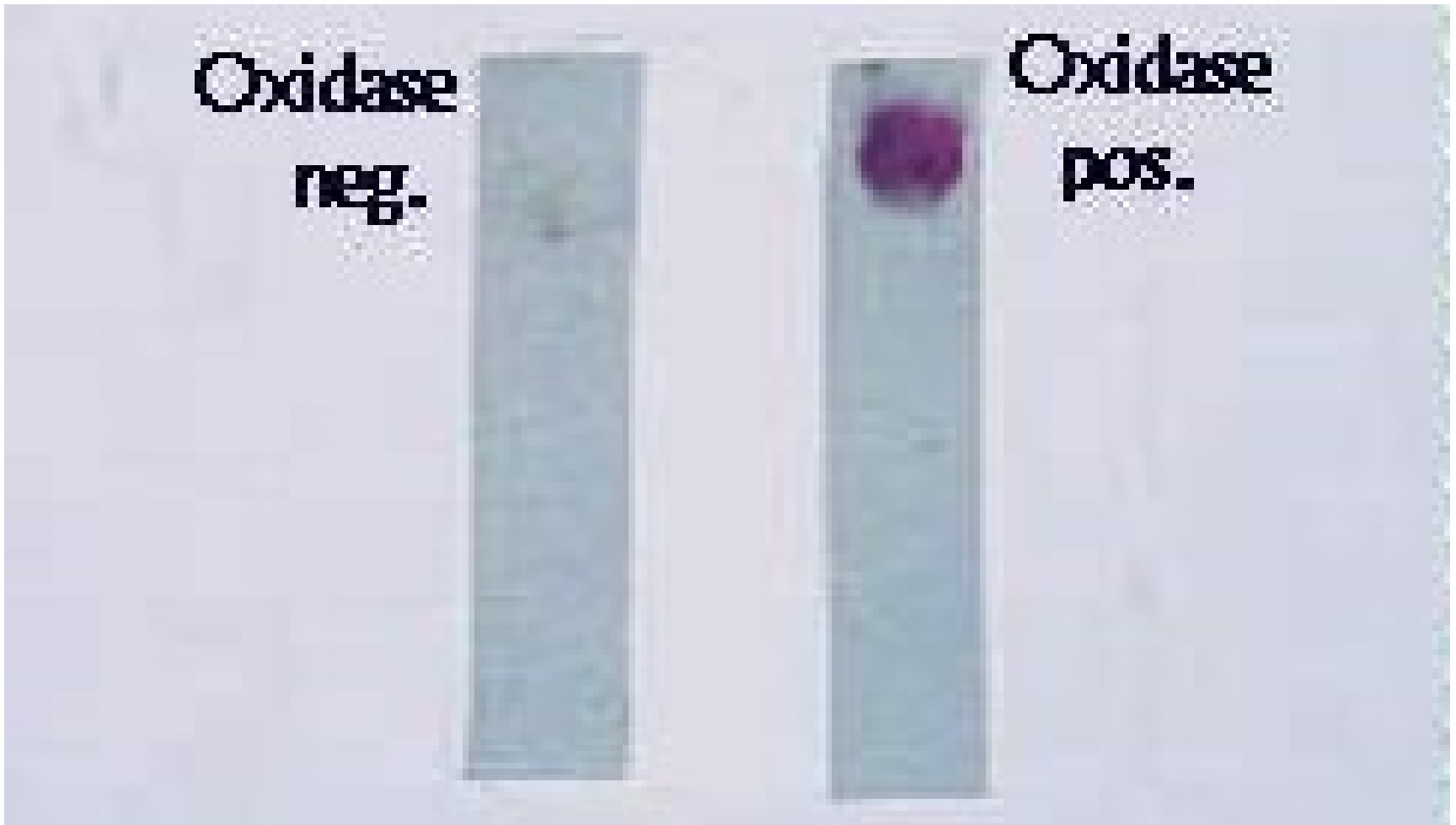
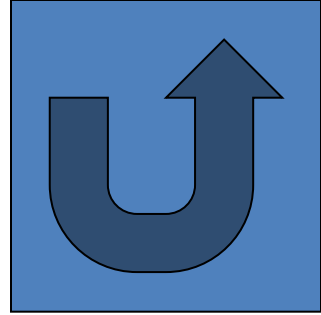
- **oxidáza** – reakční ploška **zmodrá** (nebo alespoň ta místa, kde jsme se dotkli kolonií). Pro příklady využití tohoto testu klikněte na „**i**“.
- **INAC** – reakční ploška po několika minutách **zmodrozelená**; proužek nutno před použitím navlhčit
- **PYR** – reakční ploška po několika minutách, 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.**

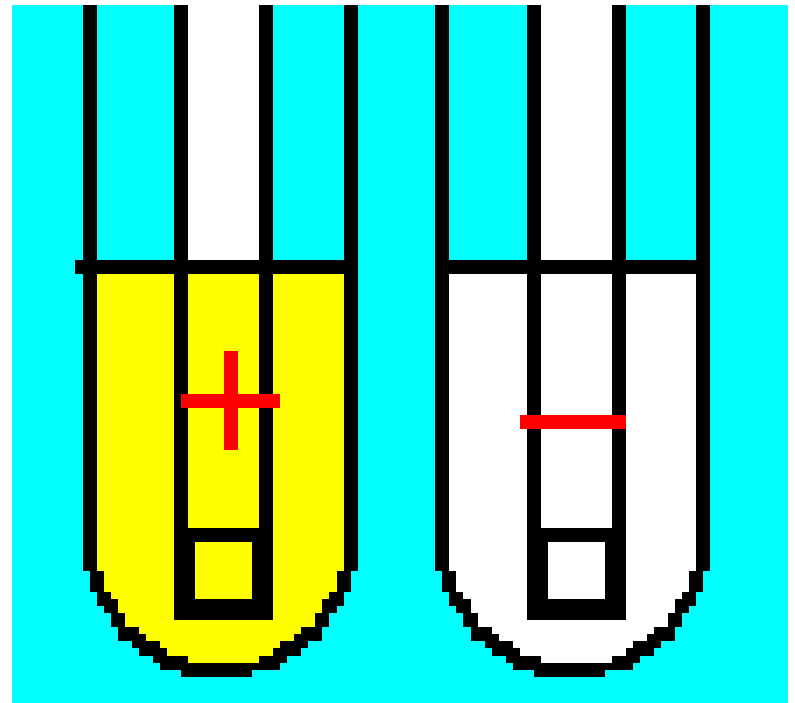
Substrát se začne uvolňovat z reakční plošky

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)

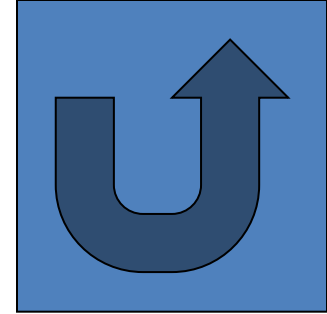
ONPG

- **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.

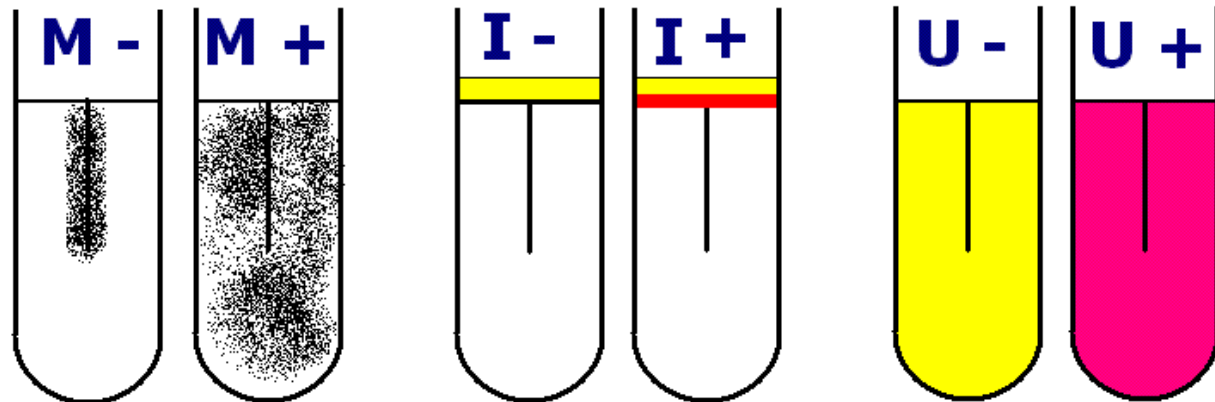
Příklad: **Citrát dle Simmonse.**

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 zrůžovění celé půdy)



- Nebo **Hajnova půda**

MIU by samozřejmě šlo dělat i jako tři jednotlivé testy: pohyb...



...indol a ureu

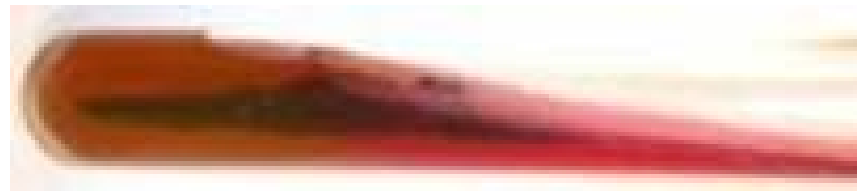
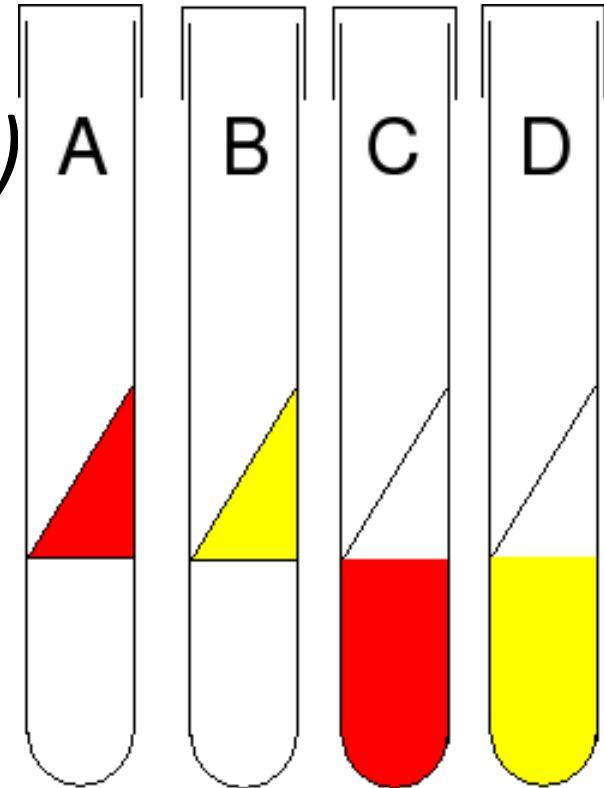
medic.med.uth.tmc.edu



Hajnova půda (*Kligler Iron*

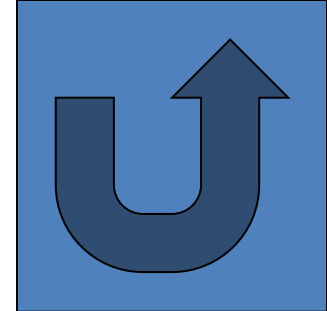
Agar – KIA v Hajnově modifikaci)

- **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



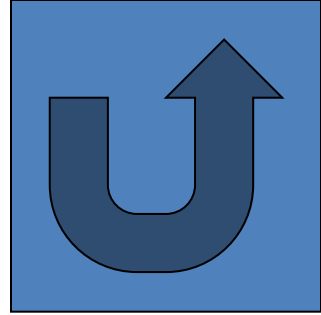
Příklad vyhodnocení

Hajna + MIU



Test	Hajna			MIU		
	Glc	Lac	H ₂ 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)*

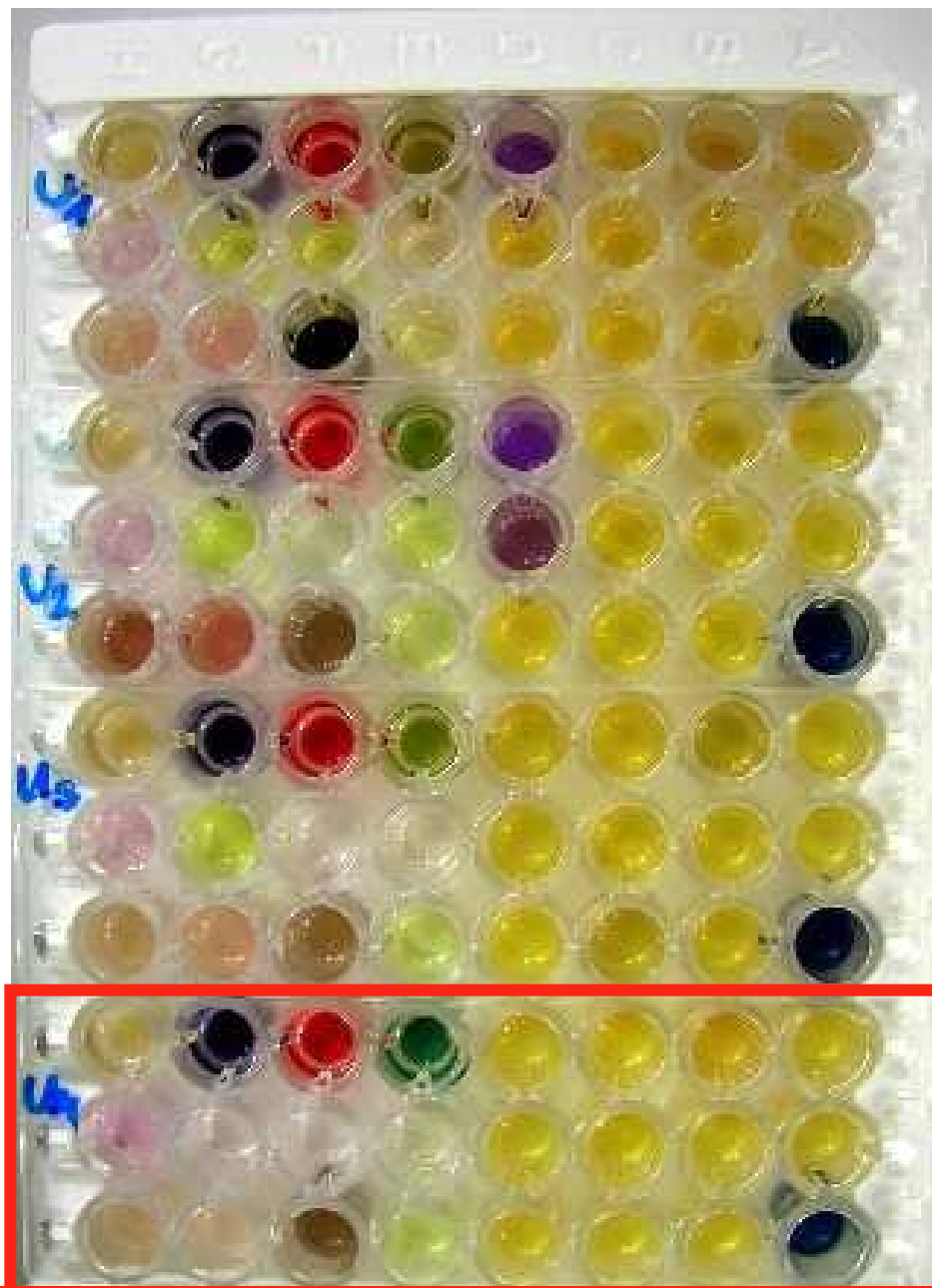
Miniaturizace: testy v plastových panelech

- **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**

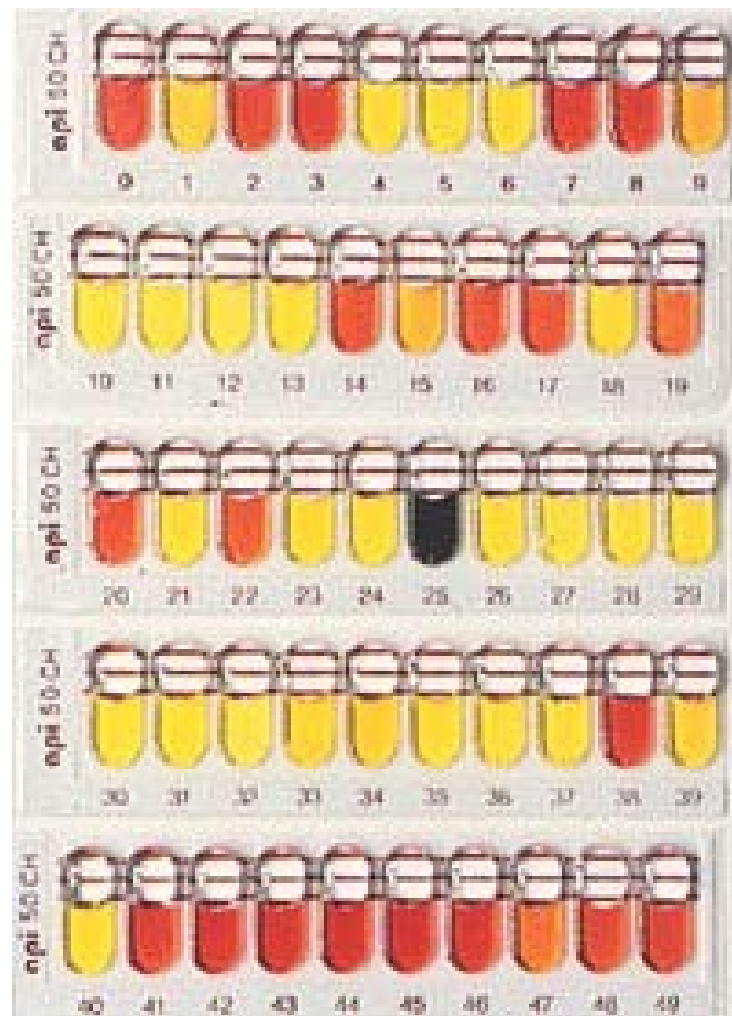
NEFERMtest 24
Erba Lachema:
do jednoho rámečku
lze vložit čtyři
trojřádky (čtyři testy,
určení čtyř různých
kmenů)



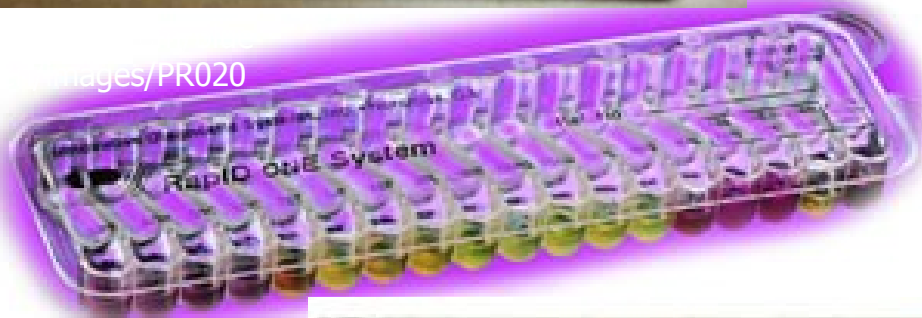
Zahraniční soupravy

(princip stejný, drobné rozdíly
v konkrétním praktickém
provedení)

www.ilexmedical.com/products_eng/api.htm



<http://www.ilexmedical.com/images/PR020>
Press/...
505.jpg





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

Oktalové 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

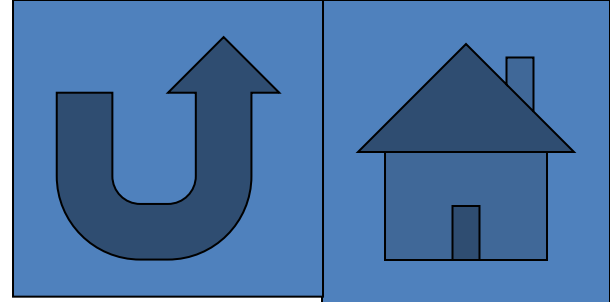
- Zaznamenají se pozitivní a negativní výsledky reakcí
- Pod každou trojici se napíše 1 – 2 – 4
- Sečtou se pro každou trojici pouze číslice u „+“, nikoli u „–“ (ty se přeškrtnou)

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

Přepočítávání trojic

--- 1 2 4		0
+-- 1 2 4	1	1
-+- 1 2 4	2	2
++- 1 2 4	1 + 2	3
--+ 1 2 4	4	4
+ - + 1 2 4	1 + 4	5
- + + 1 2 4	2 + 4	6
+ + + 1 2 4	1 + 2 + 4	7

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								
+																	
-																	
?																	
?	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	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)

www.hardydiagnostics.com

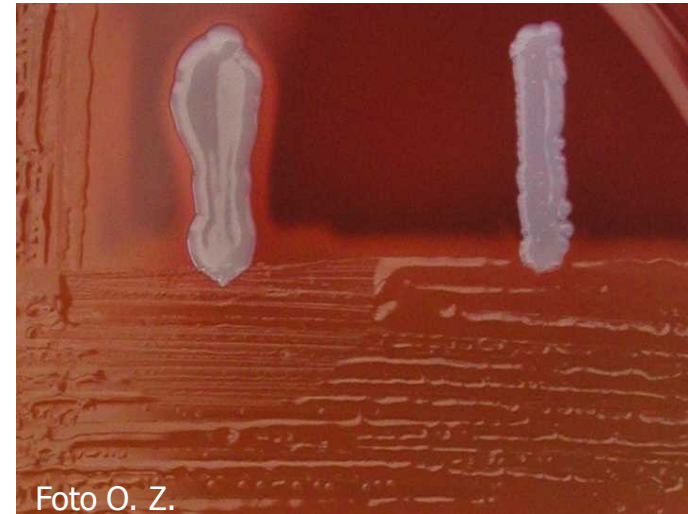
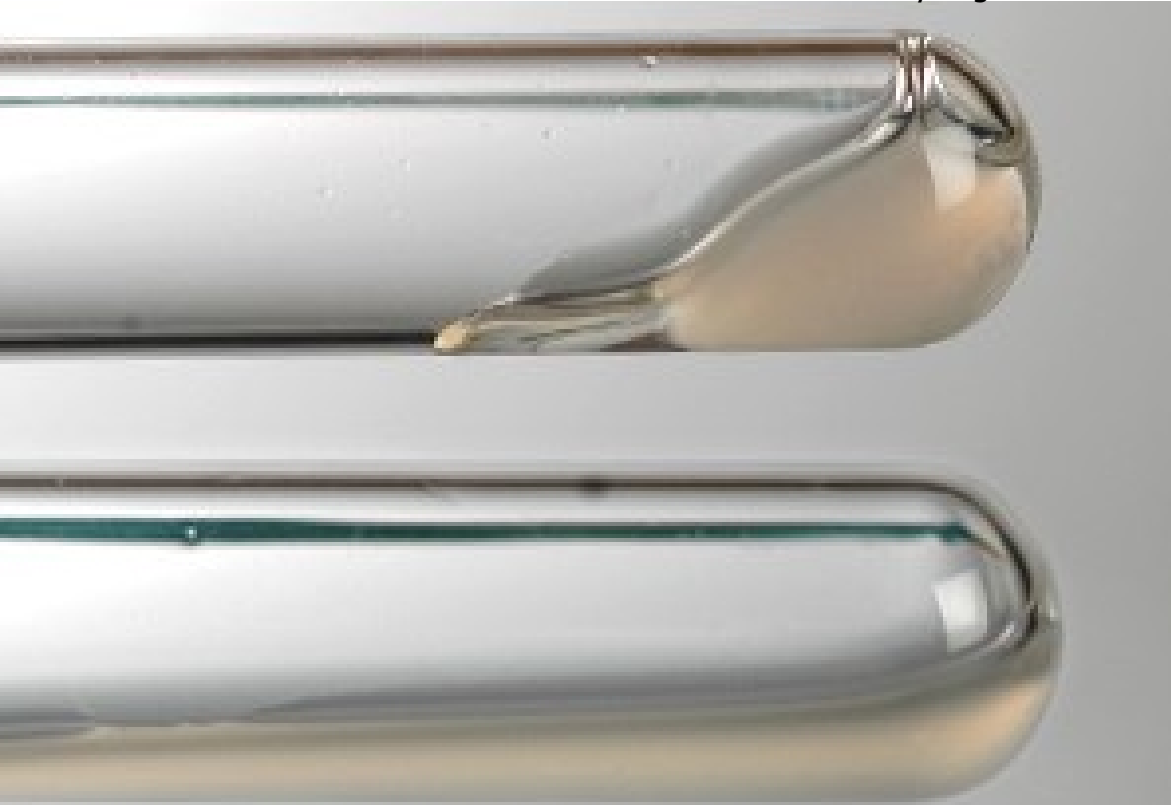


Foto O. Z.

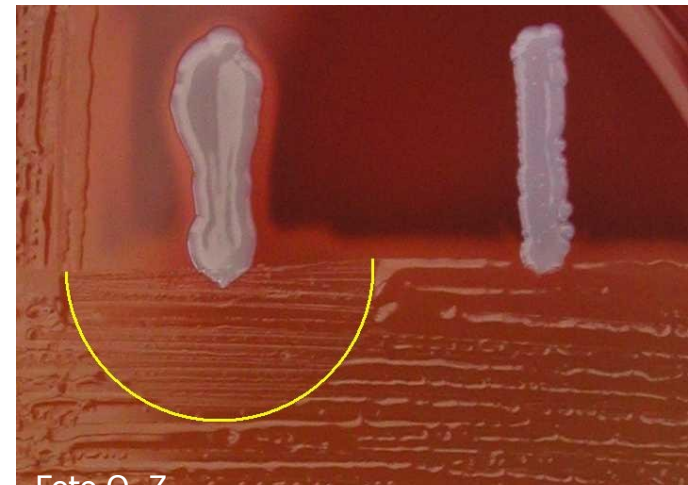
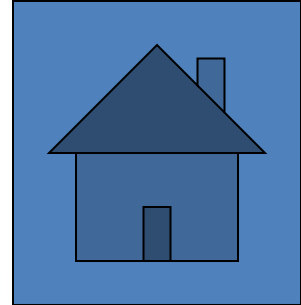
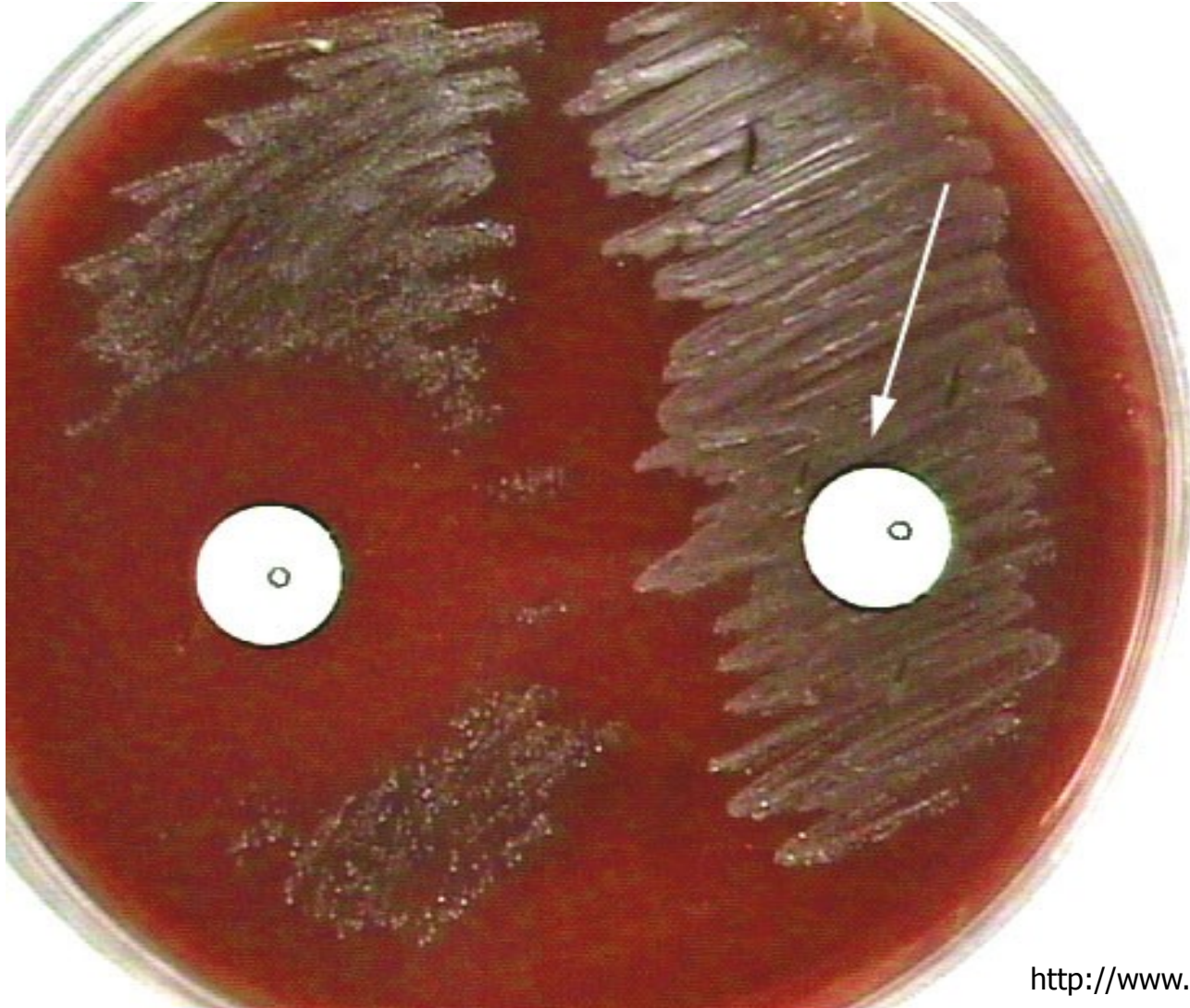


Foto O. Z.

Diagnostické použití antibiotik

- Jednou z možností je také **testování in vitro citlivosti na určité antibiotikum** v případě, že víme, že kmen X je ve 100 % citlivý a kmen Y je ve 100 % rezistentní. Ovšem ani tady těch „sto procent“ nebývá stoprocentních...
- Příkladem je třeba **optochinový test**
- **Praktické provedení je stejné jako u testů citlivosti na antibiotika**

Optochinový test negativní a pozitivní



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

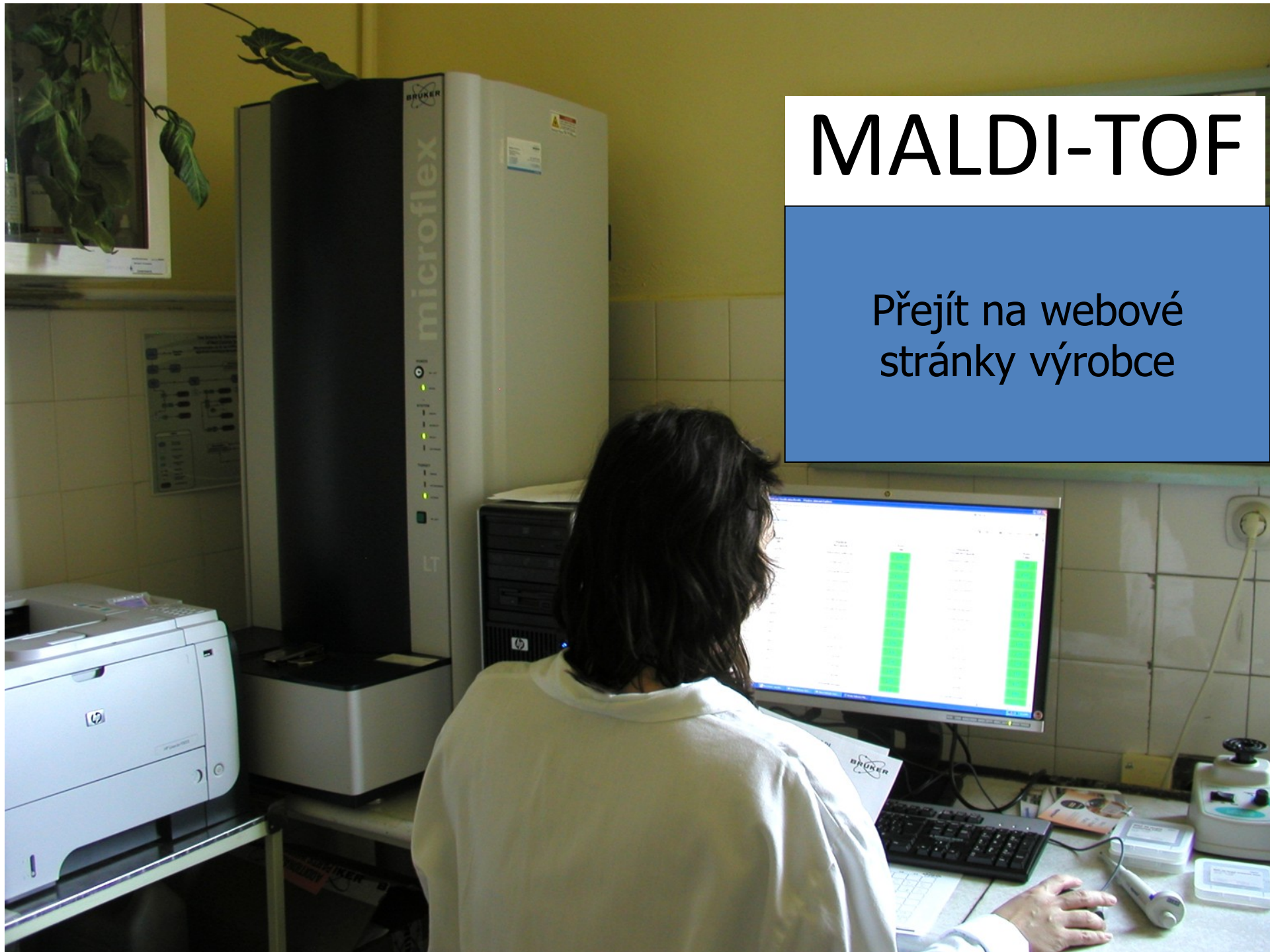
- Princip: hmotnostní spektrometrie
 - již dávno využíváno v chemii, ale **klasické způsoby umožňovaly analyzovat látky jen s nízkou molekulovou hmotností**
 - založena na **rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností**
 - nyní **díky ionizaci laserovými paprsky lze detekovat i velké 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

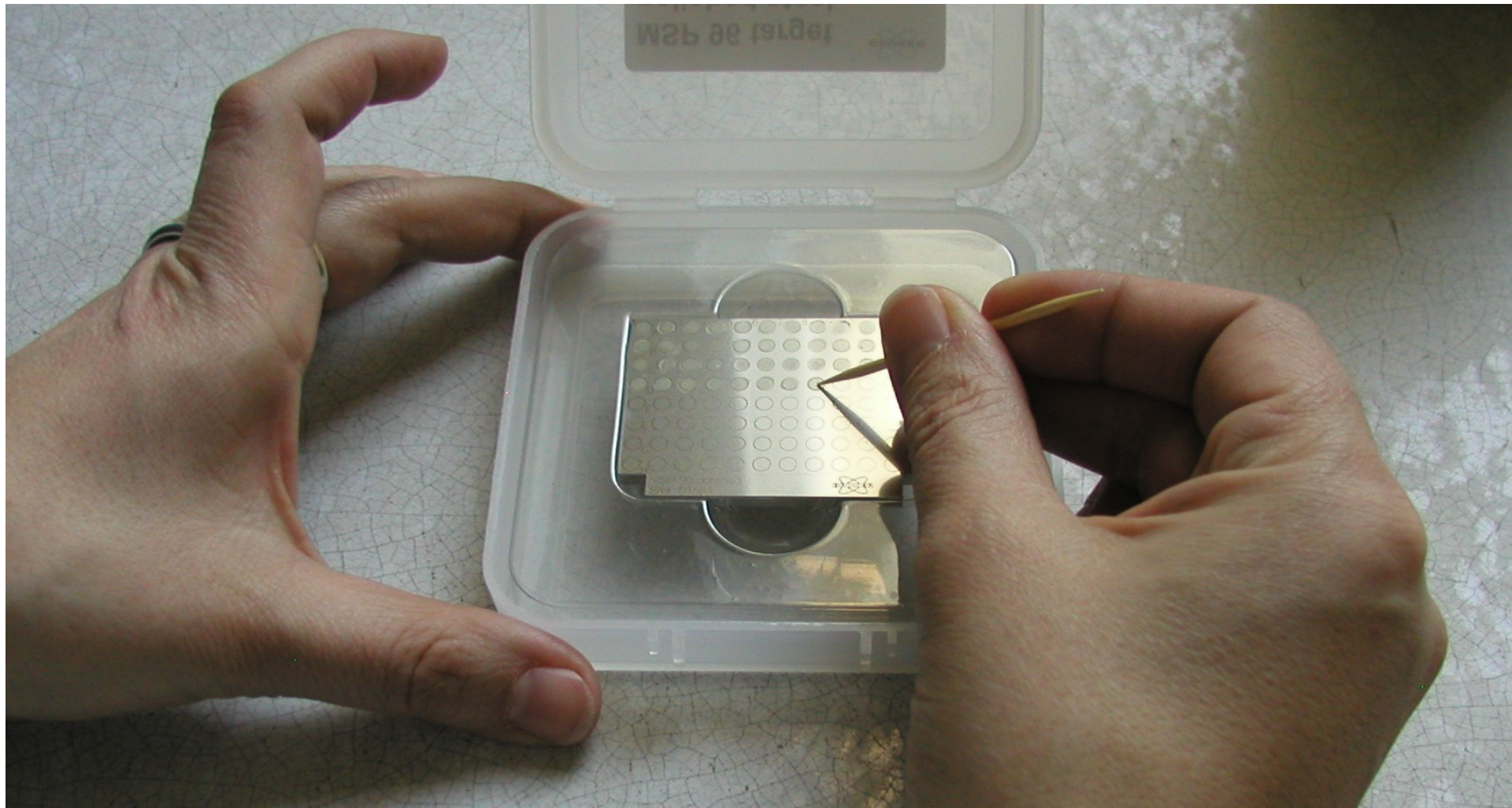
- rychlost částice (nepřímo úměrnou její hmotnosti) lze vypočítat z **doby průletu, změřené detektorem (TOF)**
- směs matrice (např. kyseliny 4-hydroxy-skořicové) a kmene na nerezové destičce je zasažena **nanosekundovým pulsem laseru**
- matrice absorbuje energii pulsu a molekuly vzorku jsou **ionizovány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

MALDI-TOF

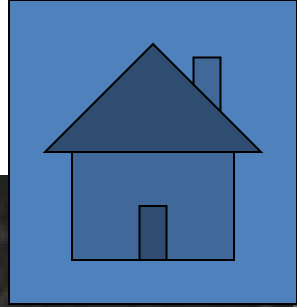
Přejít na webové stránky výrobce



Příprava kmene pro MALDI-TOF



Konec této části



CATALASE TEST

<http://www.telmeds.org>

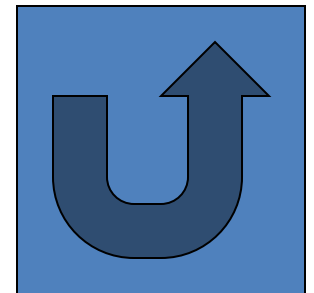
Negative

Positive



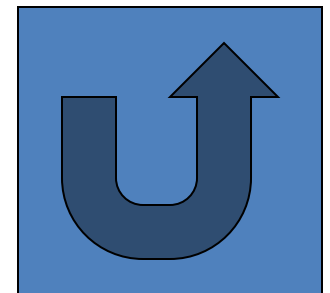
Příklady použití katalázového testu

- 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 –

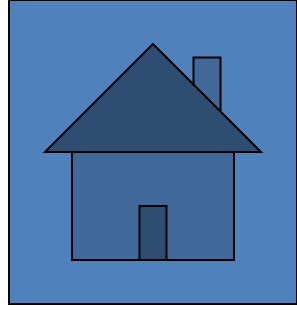


Příklady využití oxidázového testu

- 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



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 😊

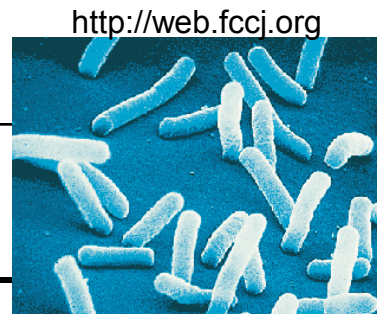
Zpět na hlavní obsah

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



<http://web.fccj.org>

<http://vietsciences.free.fr>

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

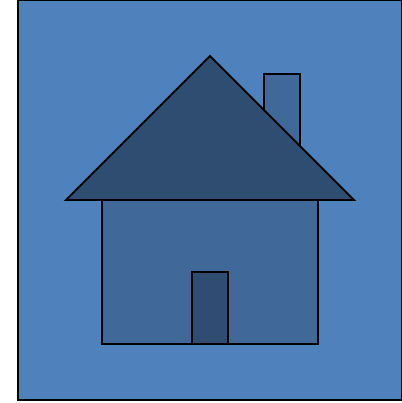
- L. si stěžovala mamince na bolesti při močení a maminka si všimla, že chodí na záchod hodně často. Lékař na středisku jí předepsal Zinnat, ale potíže se nezlepšily. Při další návštěvě ji tedy nechal vymočít do „šampusky“ a moč poslal na mikrobiologii. Přišlo mu ale, že výsledek nelze hodnotit, neboť 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 enterokokcích

- 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.



<http://www.leighday.co.uk>

<http://womansday.ninemsn.com.au>

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

Classification des aliments selon le risque lié à *Listeria monocytogenes*



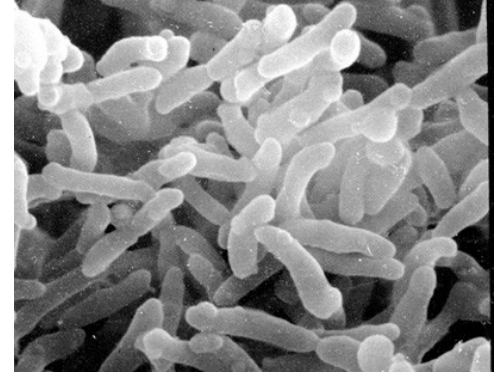
<http://www.territoire-belfort.gouv.fr>

Příběh třetí



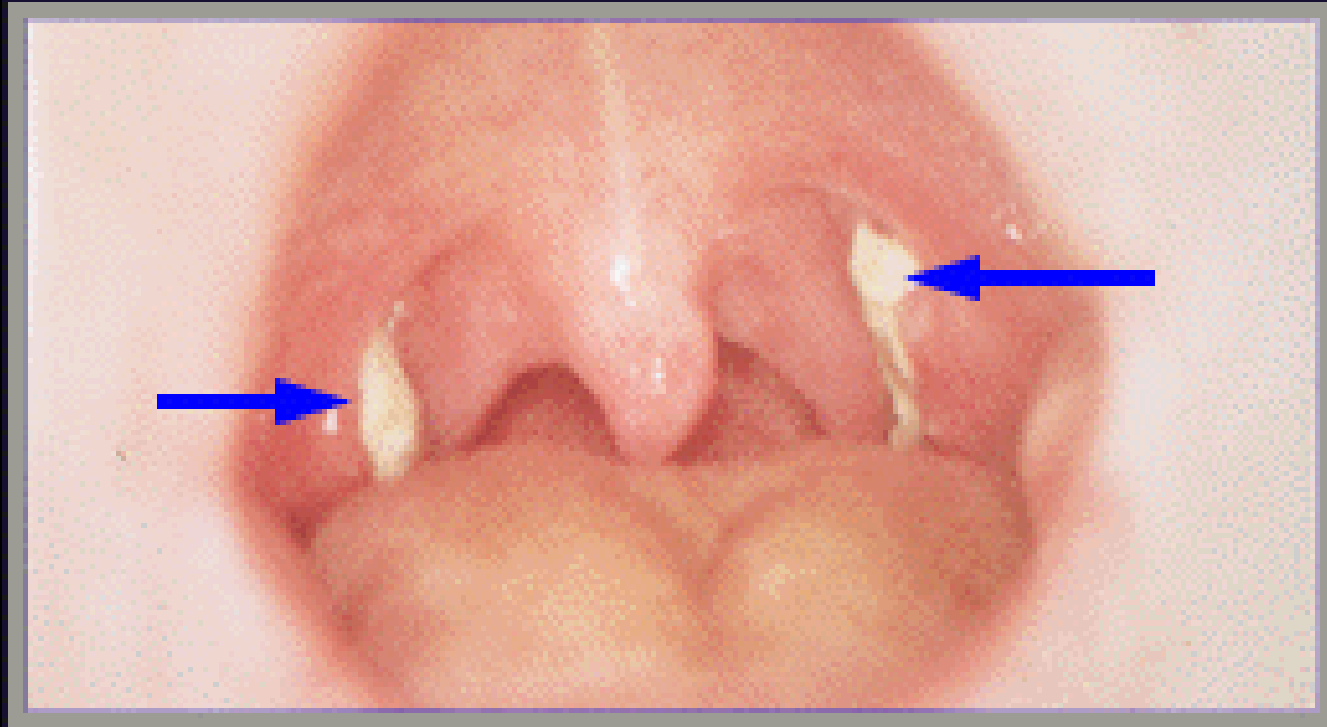
- Pan B. je diabetik, chronický pacient, nyní léčen pro **bércové vředy**. Bohužel, infekce střídá infekci. Před půlrokem byla usvědčena *Escherichia coli*, před dvěma měsíci zase *Enterococcus faecium*, blízký příbuzný enterokoka *Enterococcus faecalis*. Lékaři jsou zvědaví, co se z bércového vředu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

A už to vědí: viníkem je nyní



- *Corynebacterium jejkeium*, relativně nejobávanější ze skupiny tzv. nedifterických (= nezáškrtových) korynebakterií. Původně se mu říkalo „korynebakterium skupiny JK“.
- Korynebakteria jsou grampozitivní tyčinky kyjovitého tvaru (koryné = kyj), některá jsou pleomorfní (různotvará), popřípadě i nekonstantně probarvená.
- Do stejného rodu patří i původce záškrtu, dnes díky očkování u nás vzácný – *C. diphtheriae*.

Záškrt



Diphtheria - notice the pseudomembrane in the posterior pharynx. It can become very large and may obstruct the airway.

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

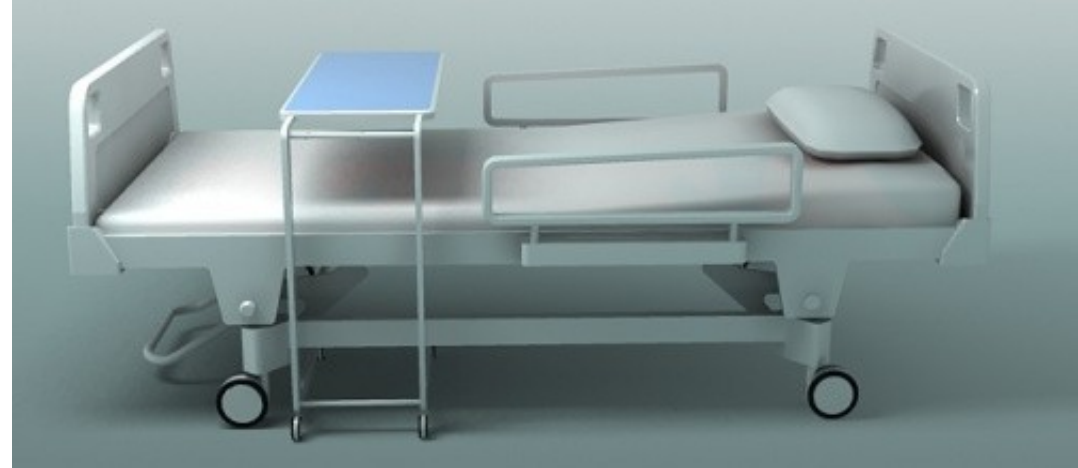
File:St Fagans Celtic village palisade.jpg, From Wikipedia, the free encyclopedia, available at http://en.wikipedia.org/wiki/File:St_Fagans_Celtic_village_palisade.jpg, visited 2012-10-02



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)

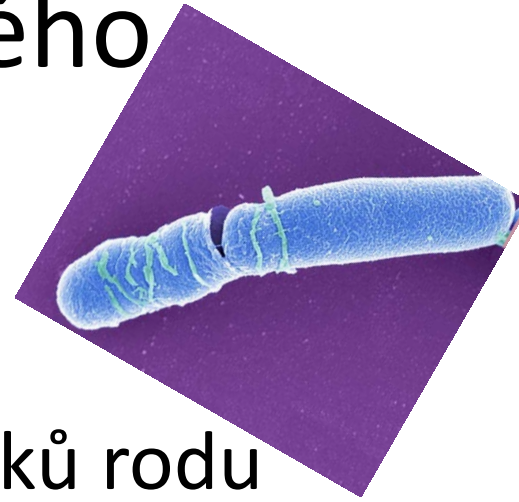
Rhodococcus jostii byl nalezen na mrtvém těle moravského markraběte a nekorunovaného římského císaře Jodoka (Jošta) zemřevšího 1411. Tělo je pohřbeno v kostele sv. Tomáše v Brně



Příběh čtvrtý

- Sestřička Blaženka se zděsila: přišly výsledky stěrů z nemocničných 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



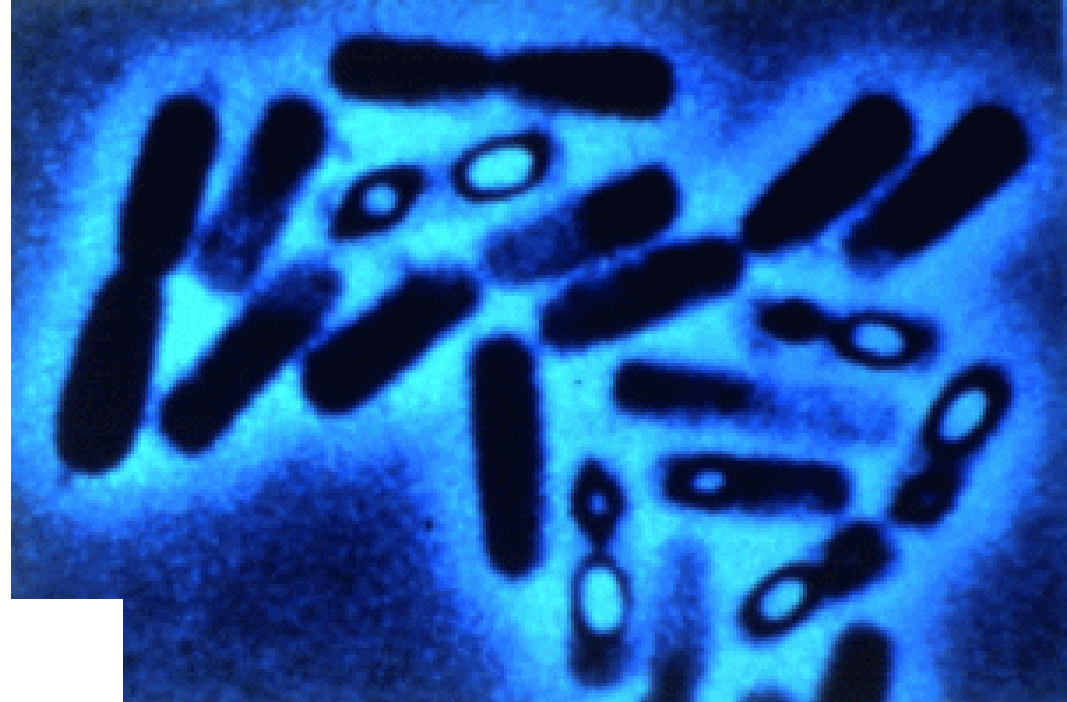
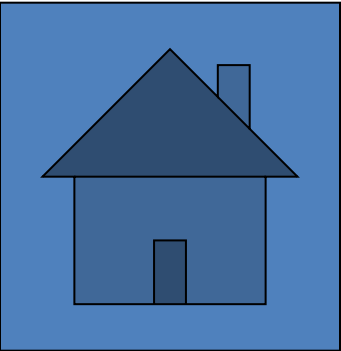
www.waterscan.co.yu

- 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)
- *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



www.cropsoil.uga.edu

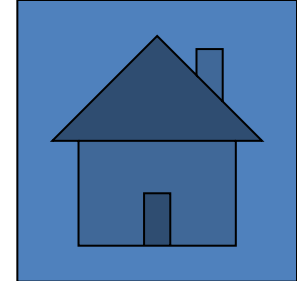
Spory *Bacillus* sp. jen někdy vyklenují (bubří) tyčinku (vegetativní buňku, která je obklopuje); mohou být terminální, subterminální či centrální

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	≥ 10	8–9	< 8
Nitrofurantoin (nitrofuran)	F	≥ 15	 	< 15
Vankomycin (glykopeptid)	VA	≥ 12	 	< 12
Tetracyklin*	TE	≥ 19	15–18	< 15
Quinu-/dalfopristin**	QD	≥ 22	20–22	< 20
Gentamicin (aminoglykosid)***	CN	≥ 8	 	< 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 řetězcí 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

Enterokoky – vzhled kolonií

<http://microbiology.mtsinai.on.ca>



Popis pachatelů (diagnostika) – 2

Enterokoky

<http://www.morgenwelt.de>



- **Biochemické testy:** kataláza negativní, možné je biochemické rozlišení, důležité štěpení arabinosy (*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

Fotografie z databáze zločinců 1

Enterokoky



Mikroskopie

Žluč-eskulin

Slanetz-Bartley

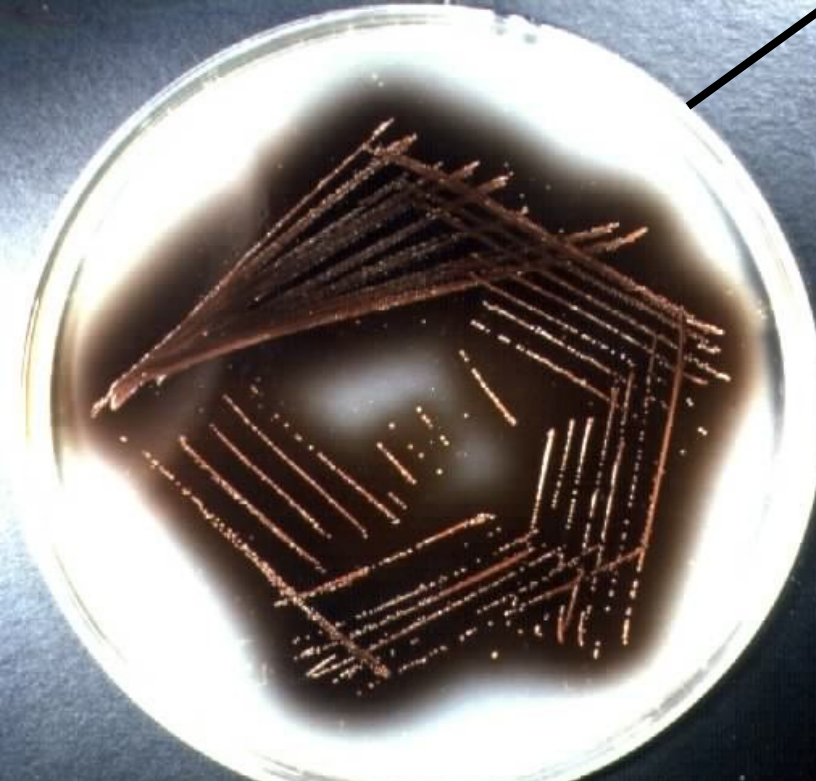


Foto: archiv ústavu
oba levé obrázky
fotografoval Prof.
MVDr. Boris
Skalka, DrSc.

Fotografie z databáze zločinců 2

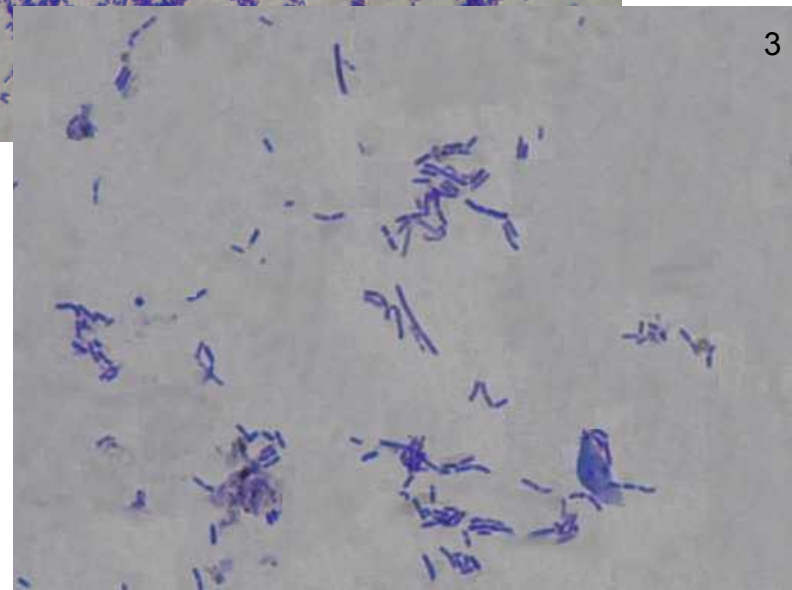
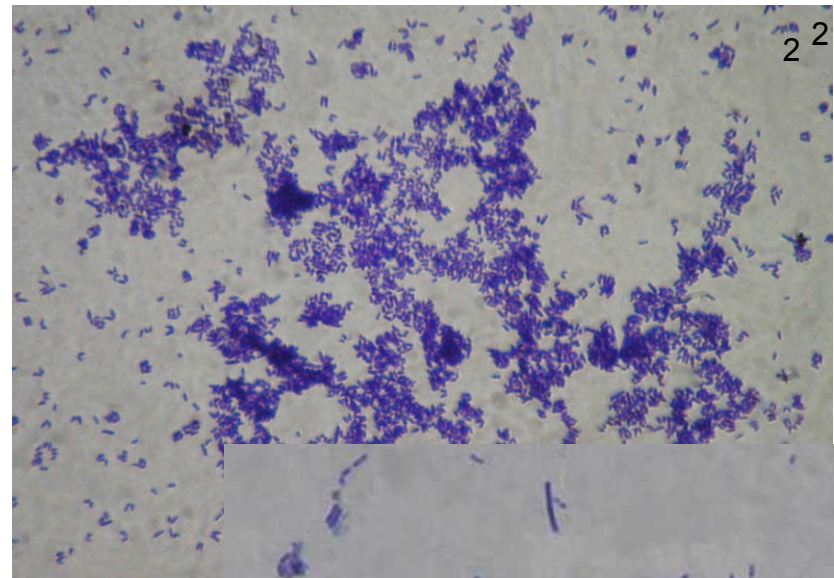
Tyčinky I

1, 2, 3 archiv ústavu

4 <http://medinfo.ufl.edu>

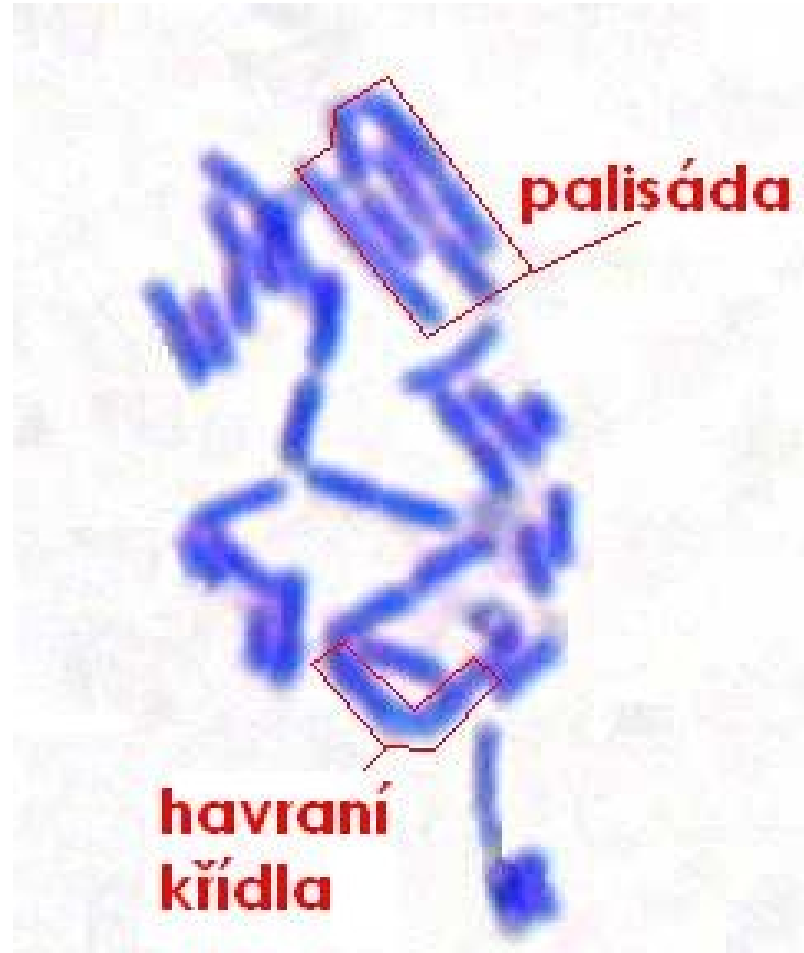
Corynebacterium Gram

Listeria – KA, Gram



Fotografie z databáze zločinců 3

Tyčinky II – korynebakteria, tvary



Fotografie z databáze zločinců 4

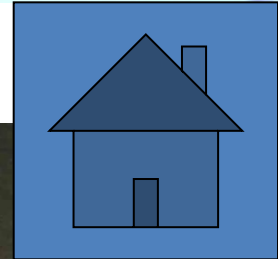
Tyčinky III

Bacillus cereus



Arcanobacterium haemolyticum

Bacillus subtilis



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 arabinózového 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!

Žluč-eskulinový agar



2. AESCULIN BILE AZIDE AGAR
Colonie di *E. faecalis*, nere, esculinasi positive.

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

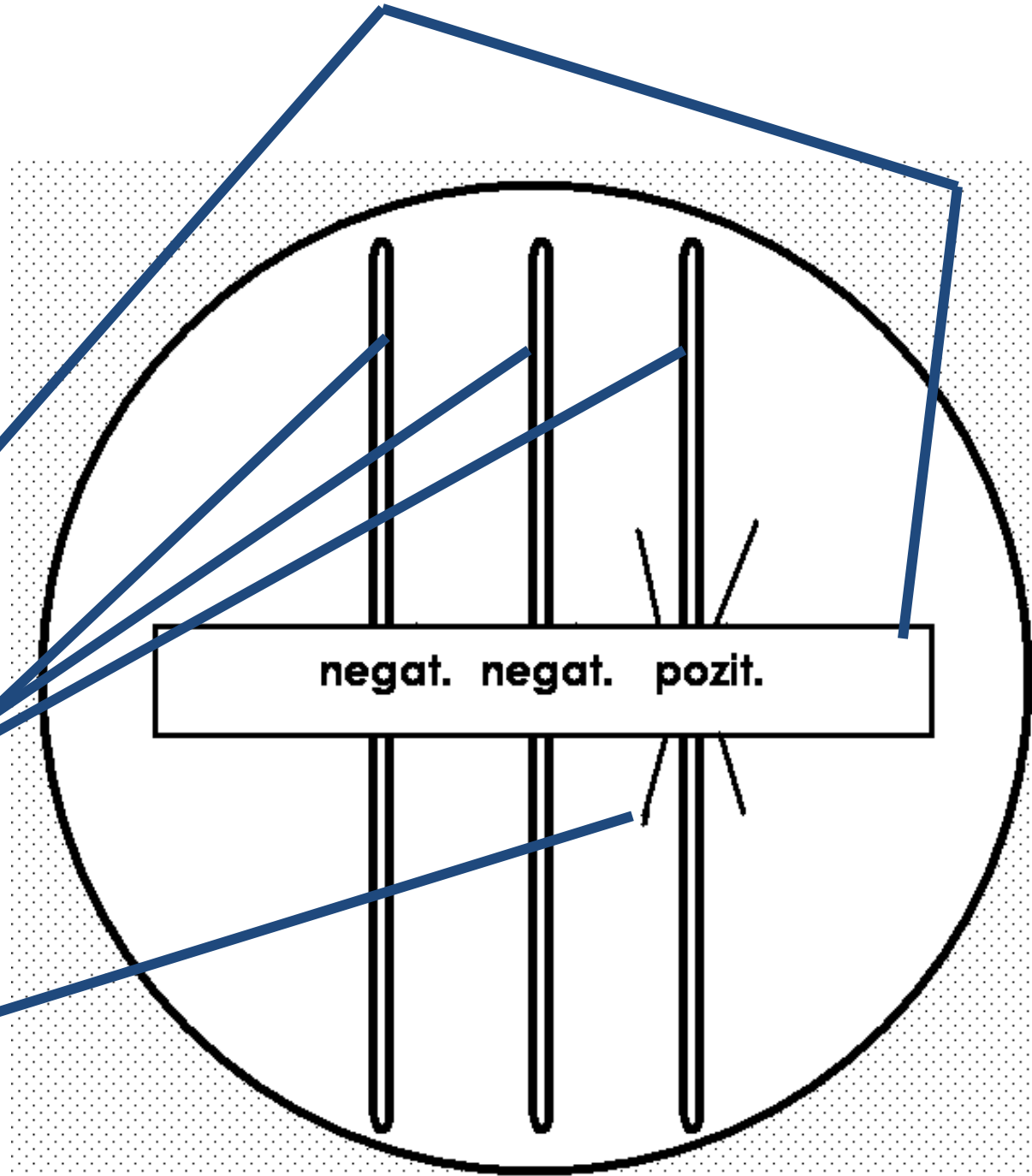
www.oxid.com



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).

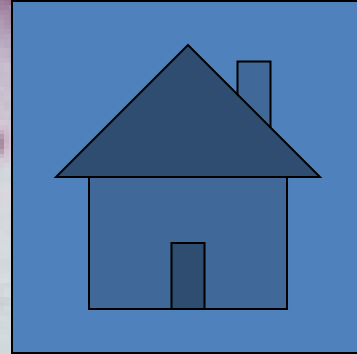
Elekův test

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

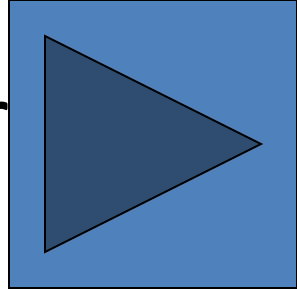
<http://www.cdphe.state.co.us>



Bacillus anthracis

Zpět na hlavní obsah

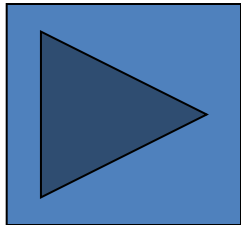
Bonus: VRE (vankomycin rezistentní enter



<http://www.morgenwelt.de/typo3temp/5ce14d39b5.jpg>

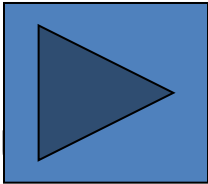
Enterokoky – charakteristika citlivosti

- 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

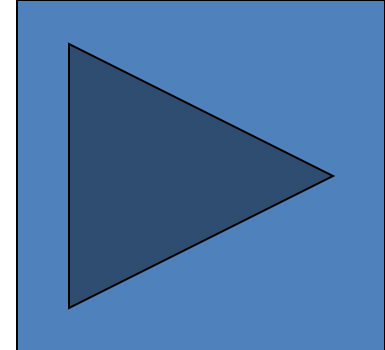


VRE – kdy jsou závažné, a proč

- 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



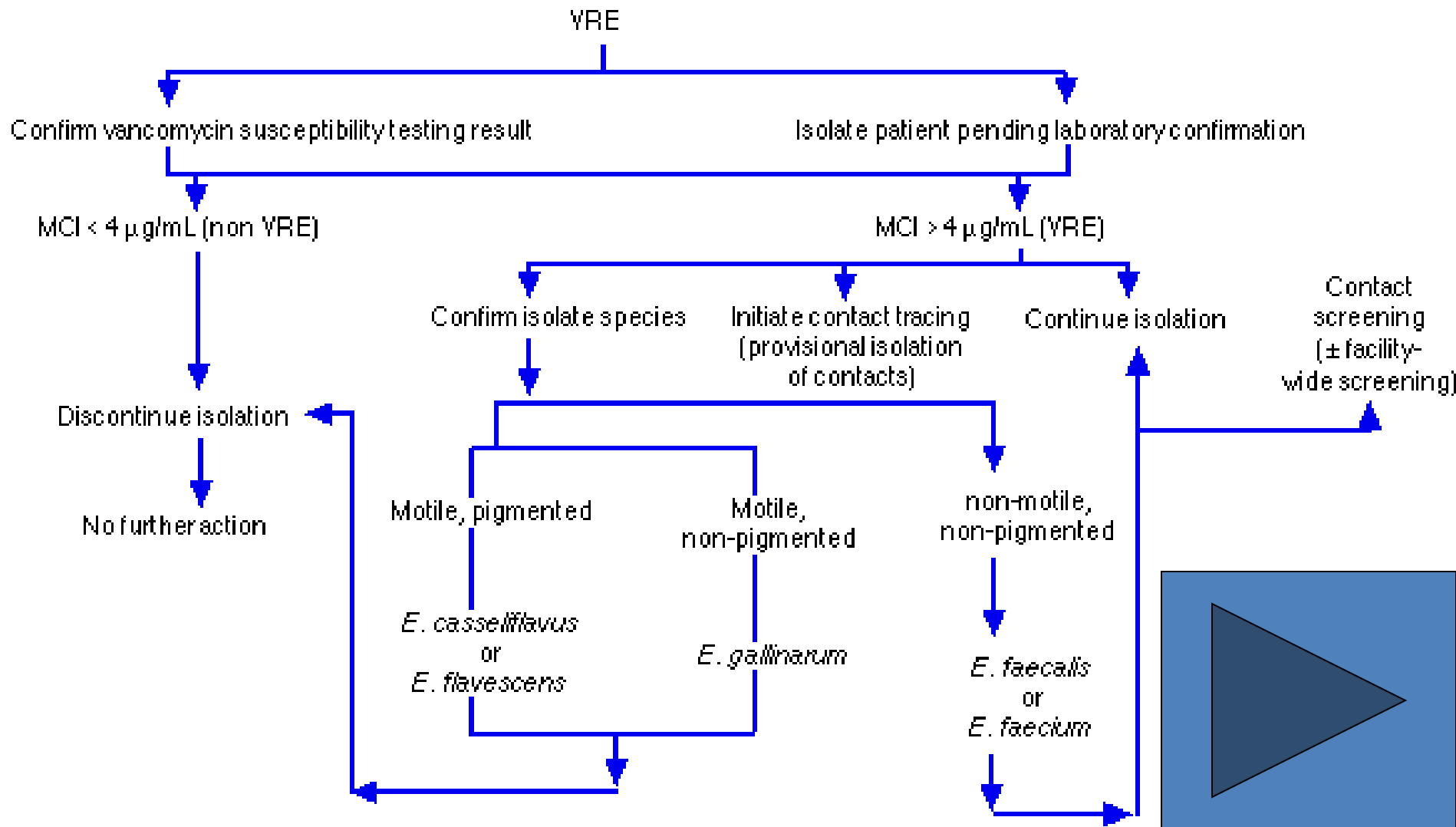
VRE v Brně



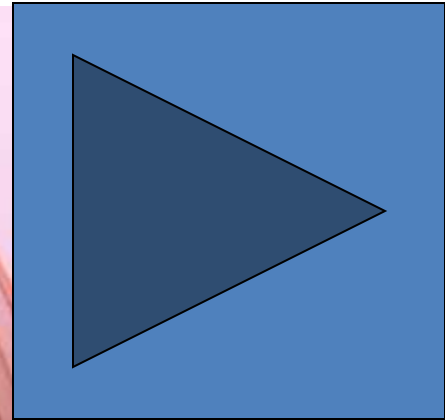
- Na MÚ LF MU a FN USA Brno byly donedávna zaznamenány pouze ojedinělé případy VRE, ale v posledním roce jich výrazně přibylo
- Naproti tomu na OKM FN Brno-Bohunice byly nálezy VRE už dříve podstatně častější
- Pravděpodobným důvodem je spektrum pacientů. VRE jsou časté u pacientů s nádorovým bujením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

Příklad systému bdělosti pro VRE

Figure 1 Infection Control Response to Report of VRE

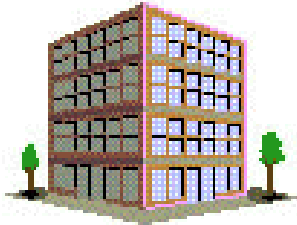


Lékem volby je linezolid (ZYVOXID),
případně dalfopristin/quinupristin
(SYNERCID)



Možné mechanismy přenosu VRE

Health care settings



Colonization of patients

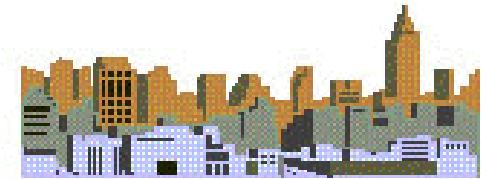
Health care transmission:
Worker hands
Environment



Colonization or infection identified due to selective antimicrobial pressure and/or underlying illness

Discharge

Community settings



Persistent colonization of discharged patients with VRE

Household transmission



Colonization of individuals

Admission

www.cdc.gov/ncidod/eid/vol13no3/mcdonald.htm

Zpět na hlavní obsah

