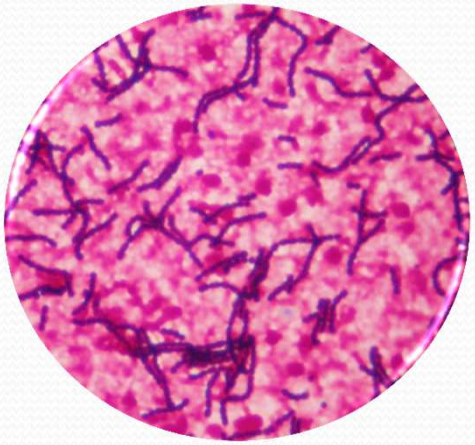
Streptococcus spp.

Rod *Streptococcus*

- Gram pozitivní koky uspořádané v řetízcích (řecky *streptos*, řetěz)
  - Lze pozorovat dvojice až řetízky
- Nepohyblivé
- Nesporulující
- Fakultativně anaerobní
- Kataláza **negativní**
  - Rychlé odlišení od bakterií z rodu *Staphylococcus*
- Oxidáza negativní
- 156 druhů
  - Rozdělení podle hemolýzy na krevním agaru
    - Alfa, Beta, Gama
    - Též na beta-hemolytické a non-beta-hemolytické
  - Rozdělení dle antigenní struktury – dle Lancefieldové
    - Polysacharid C
    - Skupiny A-Z – neobsahuje pneumokoky



Streptococcus pyogenes v HK – Gramovo barvení

Rod *Streptococcus*

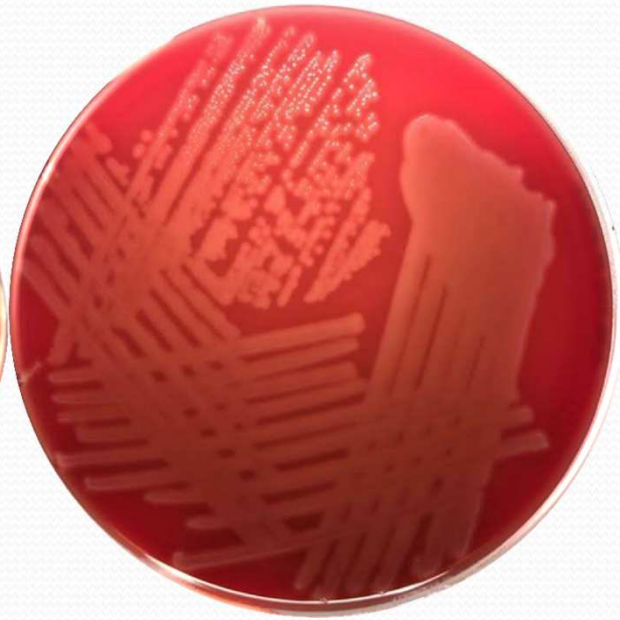
Typy hemolýzy

- Alfa hemolýza
  - Projevuje se viridací na krevním agaru (lat. *viridis*, zelený)
  - Viridaci způsobuje změna hemoglobinu na zelený verdoglobin
- Beta hemolýza
  - Projevuje se odbarvením erytrocytů v okolí kolonií na krevním agaru
  - Může být kalná nebo úplná
- Gama hemolýza
  - Na krevním agaru nedojde k žádné změně v okolí kolonií

Rod *Streptococcus*

Typy hemolýzy

Alfa hemolýza



Beta hemolýza

Gama hemolýza

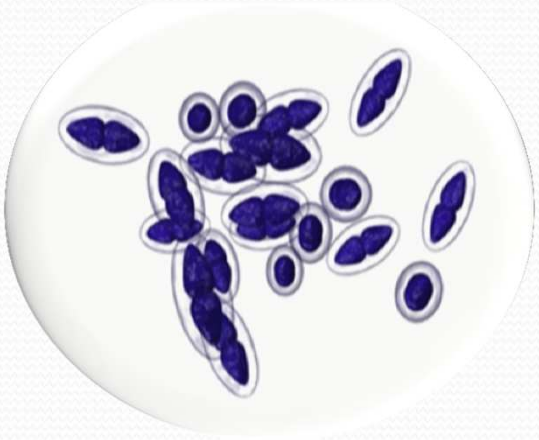
Alfa hemolytické streptokoky

- Zástupci skupiny
  - ***Streptococcus pneumoniae* - pneumokok**
  - *Streptococcus bovis*
  - *Streptococcus suis*
  - Velká skupina tzv. orálních streptokoků
- Rozdělení na základě citlivosti k optochinu či rozpustnosti ve žluči
  - Rezistentní – viridující streptokoky
  - Citlivý - *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus viridans – na KA

Streptococcus pneumoniae

- Hlavní původcem komunitních pneumonií
- Opouzdřený kok ovoidního tvaru
  - Vyskytuje se jednotlivě, ve velmi krátkých řetízcích, nejčastěji ve dvojicích
  - Odvrácené konce dvojic jsou zašpičatělé – lancetovitý tvar
    - Lanceta připomíná malé kopí
  - Pouzdro lze pozorovat mikroskopicky
- Vyskytuje se v nosohltanu, nosu a na mandlích u zdravých dospělých a dětí
  - Pneumonie jako následek snížení obranyschopnosti respiračního traktu



Streptococcus pneumoniae – lancetovitý tvar

Streptococcus pneumoniae

Antigenní struktura

- Kapsulární polysacharid
  - Více než 90 sérotypů
- F-antigen
  - Interferuje v Paul-Bunnell reakci
- C-polysacharid (není skupinově specifický)
  - Reaguje s CRP
- Povrchové antigeny
  - Významné faktory virulence

Streptococcus pneumoniae

Faktory virulence

- Polysacharidové pouzdro
  - Hlavní faktor virulence
  - Chrání před fagocytózou
- Adheziny
  - Pneumokokový povrchový adhezin A
  - Pneumokokový povrchový adhezin
  - Cholin vázající protein A (CBPA)
- Invaziny
  - Hyaluronidasa
    - Usnadňuje šíření ve tkáních
  - Neuroamidasa
    - Poškozuje tkáně a odhaluje receptory pro pneumokokové receptory

Streptococcus pneumoniae

Faktory virulence

- Pneumokokový povrchový protein A
  - Brzdí odstraňování pneumokoků z krevního řečiště
  - Působí jako receptor pro laktoferin (získávání železa, aktivace komplementu)
- Pneumolyzin
  - Poškozuje buněčné membrány aktivací fosfolipázy A
  - Působí na polymorfonukleáry, stimuluje tvoru cytokinů
- Autolyzin
  - Uvolňuje do okolí buňky pneumolyzin a další součásti buňky (např. polysacharid C)

Streptococcus pneumoniae

Patogenita

- Pneumonie
  - Nejčastější bakteriální původce komunitní pneumonie
  - Vyšší letalita u kojenců a starších lidí
- Purulentní meningitida
  - U osob nad 60 let, u očkovaných proti *Haemophillus influenzae* typu B, u batolat, po úrazech
- Otitis media acuta
  - Vysoká teplota, rychle se zesilující bolest ucha
    - Nutná paracentéza pro ulevení od bolesti
  - Může přecházet v mastoiditidu a meningitidu otogenního původu
- Akutní sinusitida
  - Sekundárně po virové infekci
- Méně časté
  - Akutní endokarditida, sepse, peritonitida, hnisavá artritida

Streptococcus pneumoniae

Identifikace

- Přímý průkaz
  - Mikrokospický průkaz
    - Gramovo barvení
      - Gram pozitivní opouzdřené koky ve dvojicích s typickým lancetovitým tvarem
    - Burriho barvení
      - Negativní znázornění pouzder tuší
  - Kultivační průkaz
    - Průkaz přítomnosti viabilních kmenů v klinickém materiálu
    - ➢ Bližší určení z izolovaného kmene
  - Průkaz bakteriálních složek klinickém materiálu
    - Průkaz antigenu v moči (u dospělých)

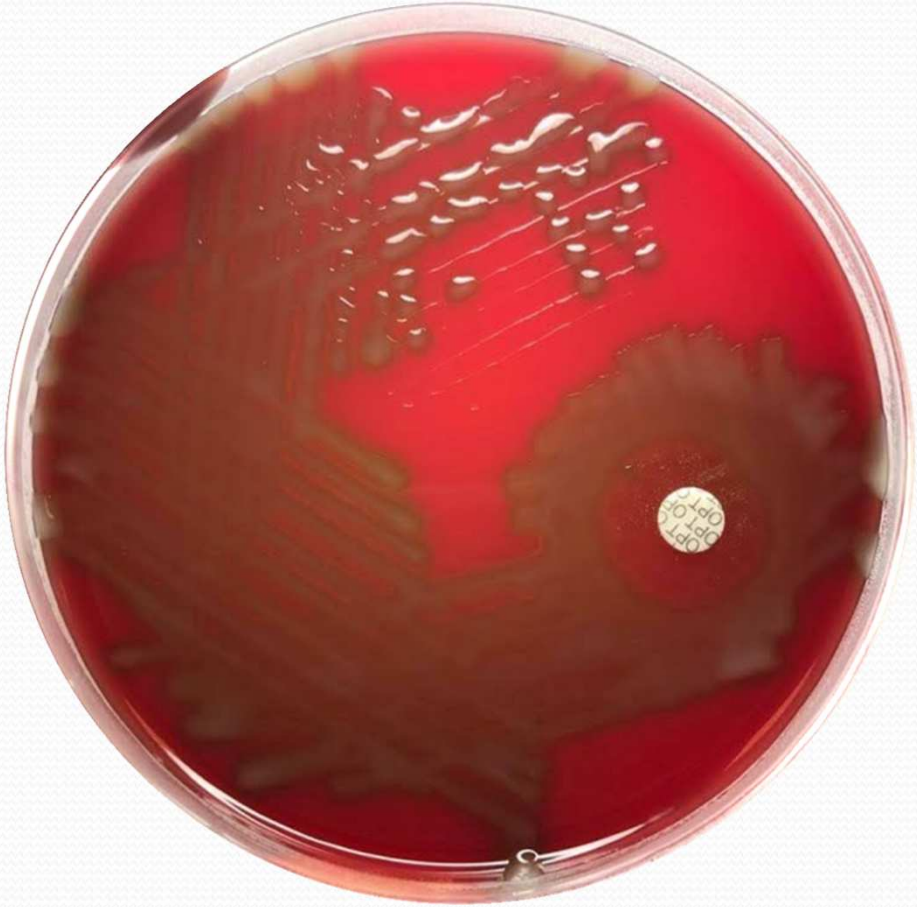
Streptococcus pneumoniae

Identifikace – kultivace

- Roste dobře na KA
- Na KA s alfa-hemolýzou (v aerobních podmínkách)
- Rozlišujeme několik fenotypů kolonií podle růstové fáze
  - M-fáze
    - Kolonie jsou bezbarvé, nepravidelné, připomínající kapku oleje
    - Způsobené tvorbou pouzdra
    - Vysoce virulentní kmeny
  - S-fáze
    - Velké lesklé kolonie na začátku s vypouklým profilem, který se postupně ve středu propadá
    - Snížená tvorba pouzdra, propad způsoben autolýzou
    - Virulentní kmeny
  - R-fáze
    - Drsné kolonie podobné viridujícím streptokokům
    - Netvoří pouzdro
    - Avirulentní kmeny
- Podmínky kultivace
  - 37 °C 18-24 hod aerobně se zvýšenou tenzí CO_2

Streptococcus pneumoniae

Identifikace – kultivace



Streptococcus pneumoniae
M-fáze + test k optochinu

Streptococcus pneumoniae

Identifikace – bližší určení

- Kataláza negativní
  - Odlišení od bakterií z rodu *Staphylococcus*
  - Peroxid vodíku, který se tvoří při růstu kolonií způsobuje postupně lýzu kolonií
  - Principem metody je reakce peroxidázy s peroxidem vodíku, kdy peroxidáza katalyzuje reakci s peroxidem vodíku za vzniku H_2O a oxidovaného substrátu (O_2), který je viditelný ve formě bublinek
- Citlivý k optochinu (ethylhydrocuprein hydrochlorid)
  - Odlišení od ostatních viridujících streptokoků
  - Optochin je vyráběný ve formě disků, které jsou kladeny na naočkovanou kulturu vyšetřovaného kmene na KA
  - Po 24 hodinách kultivace se hodnotí ne/přítomnost inhibiční zóny
  - Kmen je citlivý, pokud je inhibiční zóna ≥ 14 mm

Streptococcus pneumoniae

Identifikace – bližší určení

- Citlivý ke žluči a žlučovým solím
  - Odlišení od ostatních viridujících streptokoků
  - Přidání ke koloniím způsobí aktivaci autolytických enzymů (autolyzinu)
  - Test se provádí přidáním žluče či žlučových solí ke koloniím resuspendovaných ve fyziologickém roztoku o zákalu 0,5 McFarland
  - Poté se inkubuje při 37 °C 30 minut
  - V případě pozitivity se zákal vyčeří

Streptococcus pneumoniae

Identifikace – průkaz bakteriálních složek

- Imunochromatografický test pro kvalitativní stanovení antigenu *Streptococcus pneumoniae* v klinickém materiálu
  - V moči u pneumonií
  - V mozkomíšním moku u meningitid
- Test je založen na barevné reakci Ag ve vzorku se značenou protilátkou navázanou na testovacím proužku
- Výsledek za 15 minut
  - Pozitivní dva proužky
  - Negativní jeden proužek

Streptococcus pneumoniae

Prevence a terapie

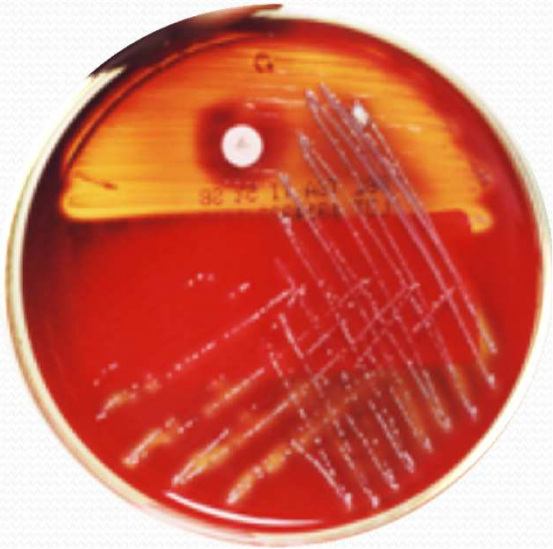
- Terapie
  - Lék volby – penicilin
    - Rezistence způsobená změnami v cílových molekulách betalaktamů
    - Lze překonat vyšším dávkování
  - Alternativně
    - Makrolidová ATB
  - Synergismus s amynoglykosidovými ATB
    - U závažných infekcí
- Prevence
  - Očkování pomocí pouzderných antigenů
    - Pneumo 23
      - Polysacharidová vakcína proti 23 nejčastějším kmenům
      - Neindukuje tvorbu protilátek u dětí do 2 let
    - Konjugované vakcíny
      - Antigeny vázané na nosič
      - Indukují tvorbu protilátek i u dětí mladších 2 let

Beta-hemolytické streptokoky

- Velká skupina podmíněně patogenních streptokoků
- Rozdělení podle antigenní struktury dle Lancefieldová
  - Skupiny A-Z
- Zástupci skupiny
  - ***Streptococcus pyogenes***
  - ***Streptococcus agalactiae***
  - *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*
  - *Streptococcus anginosus*
  - *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*

Streptococcus pyogenes

- Beta-hemolytický streptokok skupiny A dle Lancefieldové
- Nejvíce patogenní druh z rodu streptokoků
- Mikroskopicky nelze odlišit od ostatních streptokoků
- Některé kmeny opouzdřené
  - Pouzdro – kyselina hyaluronová



Streptococcus pyogenes – na KA

Streptococcus pyogenes

Antigenní struktura

- M-protein
  - ***Hlavní faktor virulence***
  - Má fibrilární strukturu vyčnívající z buněčné stěny ven
    - Dva spirálovitě svinuté řetězce
    - Karboxy koncem vázaný do stěny
  - Umožňuje adherenci a průnik bakterií do buňky
    - Adhezin a internalizin (průnik) na epiteliích kůže a sliznic
  - Inhibuje působení komplementu a chrání před fagocytózou
    - Vazba regulačního faktoru H komplementu na vlákno zamezí ukládání C3b na povrch buňky
    - Vazba Fibrinogenu na vlákno
  - Složení amino konce je velmi variabilní
    - Rozeznáváme více než 100 serotypů
    - Vytváří se vůči nim typově specifická imunita
    - Některé serotypy vyvolávají spíše infekci nosohltanu (M1, 3, 4, 12), infekci kůže (M2, 49), jiné mají vztah k revmatické horečce (M1, 3, 5, 16) nebo akutní glomerulonefritidě (M2, 49, 55, 57)

Streptococcus pyogenes

Antigenní struktura

- Sérový opacitní faktor - lipoproteinasa
  - Protein blízký proteinu M
  - Způsobuje opacitu (kalení) séra
  - Pro typizaci kmenů, které nelze určit pomocí M-proteinu
- Protein T
  - Typizace důležitá pro epidemiologii kde není možné určit protein M

Streptococcus pyogenes

Faktory virulence - povrchové

- M-protein
  - Viz výše
- F protein
  - Váže fibronektin
  - Podílí se na vazbě streptokoků na faryng a kůži
- Proteiny blízké proteinu M
  - *Mrp*, *Enn*, atd.
  - Působí proti fagocytóze
    - Vazba na fibrinogen a na Fc oblasti IgG a IgA protilátek
- Pouzdro z kys. hyaluronové
  - Chrání před fagocytózou
- Kyselina lipoteichoová
  - Adherence streptokoků
  - Tvorba protilátek proti nim brání před adhezi k buňkám v dutině ústní

Streptococcus pyogenes

Faktory virulence - extracelulární

- Streptolyzin O
  - Oxygenlabilní antigenní hemolyzin aktivní v redukované formě
  - Váže se na cholesterol v buněčné stěně a způsobuje tvorbu pórů
  - Protilátky proti němu slouží k diagnostickým účelům nedávno proběhlých infekcí a jejich pozdním následkům
    - ASLO – anti-streptolyzin O
- Streptolyzin S
  - Oxygenstabilní neantigenní hemolyzin
  - Je cytotoxický pro buňky, které je fagocytovaly

Streptococcus pyogenes

Faktory virulence - extracelulární

- Streptokinasa a enolasa
  - Průnik ve tkáni
  - Vážou plasminogen čímž na povrchu bakterie vzniká plasmin, který aktivuje melanoproteinasy a kolagenasy
- Hyaluronidasa
  - Průnik ve tkáni
  - Rozpouští buněčné tmely a pojivo
- C5a-peptidasa
  - Inhibuje chemotaxi leukocytů
    - Štěpí komplementový fragment C5a

Streptococcus pyogenes

Faktory virulence - extracelulární

- Streptokokové pyrogenní exotoxiny (*Spe*)
  - Může tvořit několik typů
  - Typ A a C jsou vázané na lysogenní konverzi
    - Gen přenesen prostřednictvím bakteriofága
    - Dříve označovány jako spálový nebo erytrogenní Dickův toxin
  - Typ B je ve všech buňkách
    - Gen je na chromosomu
    - Produktem je cysteinová protesa – průnik streptokoků
  - Spe účinkují jako superantigeny
    - Aktivace vysokého počtu T-lymfocytů – cytokinová bouře
    - Streptokokový syndrom toxického šoku

Streptococcus pyogenes

Patogenita

- Akutní tonsilofaryngitida
  - Nejběžnější streptokokové onemocnění
  - Pyrogenní kmeny způsobují vyrážku a malinový jazyk – spála (*scarlatina*)
  - Komplikace můžou být hnisavé (peritonsiální nebo retrofaryngeální absces, otitis media, aj.), toxické (syndrom streptokokového toxického šoku) či pozdní
- Pyodermie
  - Pozdním následkem je glomerulonefritida
  - Povrchová infekce – impetigo
  - Hlubší ostře ohraničený zánět – *erysipelas* (růže)
  - Zánět podkoží – cellulitis
  - Hluboké invazivně šířící se infekce – *nekrotizující fascititida, phlegmona, myonecrosis*
    - Komplikace sepse

Streptococcus pyogenes

Patogenita

- Syndrom streptokokového toxického šoku
  - Vyznačuje se zánětem měkkých tkání, bolestivostí, horečkou, nauseou, průjmy, příznaky šoku
- Pozdní sterilní následky streptokokový infekcí
  - Revmatická horečka
    - Nehnisavý zánět srdce, kloubů, CNS a kůže
    - Několik týdnů po streptokokové angině
    - Provázeno celkovými známkami zánětu a zvýšenou hladinou protilátek ASLO
  - Glomerulonefritida
    - Chorobné změny způsobeny usazováním imunokomplexů v glomerulech

Streptococcus pyogenes

Terapie

- Lék volby – penicilin
  - Alternativně makrolidy, linkosamidy
- Důležitým cíle terapie je zabránit vzniku pozdních následků

Streptococcus pyogenes

Identifikace – kultivace

- Roste dobře na KA
- Na KA s úplnou alfa-hemolýzou
  - Tvoří drobné, lesklé kolonie
- Podmínky kultivace
  - 37 °C 18-24 hod aerobně se zvýšenou tenzí CO_2

Streptococcus pyogenes

Identifikace – bližší určení

- Latexová aglutinace
  - Metoda slouží pro rozdělení beta-hemolytických streptokoků do skupin A, B, C, D, F, G dle Lancefieldové aglutinací
  - Test využívá latexové suspenze specifické pro skupiny A, B, C, D, F a G
  - Nejprve je antigen ze vzorku extrahován v enzymatické reakci a poté je identifikován pomocí latexových částic potažených skupinově specifickými homologními protilátkami
  - V přítomnosti protilátky latexové částice aglutinují, při jeho absenci zůstávají v homogenní suspenzi
- PYR test
  - Diagnostický test pro průkaz přítomnosti pyrolidonylpeptidázy
  - *Strep. pyogenes* je pozitivní
  - Slouží k rychlému odlišení od ostatních streptokoků

Streptococcus pyogenes

Identifikace – průkaz bakteriálních složek

- Imunochromatografický test pro kvalitativní stanovení antigenu *Streptococcus pyogenes* ve výtěru z krku
- Metoda založená na vazbě značené protilátky na antigen ve vzorku
- Vzniklý komplex se váže na druhou protilátku navázanou na membráně testu
- Výsledek za 15 minut
  - Pozitivní dva proužky
  - Negativní jeden proužek

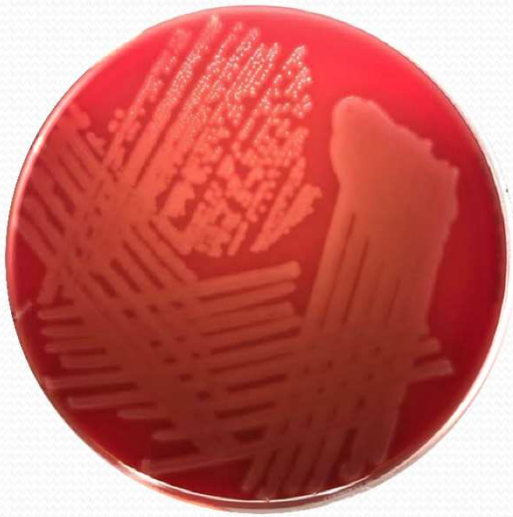
Streptococcus pyogenes

Nepřímý průkaz

- Průkaz protilátek ASLO a antideoxyribonukleasy B (ANDB)
  - Stanovení při podezření na pozdní následky
  - Hladina ASLO je u dospělých normálně pod 200 m.j.
  - Po angině hladina stoupá, u revmatické horečky zůstává zvýšená

Streptococcus agalactiae

- Beta-hemolytický streptokok skupiny B dle Lancefieldové
  - Též označován jako GBS – *group B streptococci*
- Mikroskopicky nelze odlišit od ostatních streptokoků
- Kolonizuje vaginu a střeva u ¼ těhotných
  - U poloviny z nich dojde k přenosu na novorozence
- Kolonizuje dále tonsily či respirační trakt
- Původcem mastitid u krav



Streptococcus agalactiae – na KA

Streptococcus agalactiae
Antigenní struktura

- Typově specifické pouzderné polysacharidové Ag
- Rozlišujeme 10 sérotypů
  - Rozlišení významné epidemiologicky v praxi se běžně nepoužívá
- Serotyp III
  - Převažuje u novorozenců se sepsí či meningitidou
  - Faktorem virulence pouzdro s kys. sialovou
    - Brzdí aktivaci komplementu a fagocytózu
- Serotyp V
  - Více než polovina rezistentních k erytromycinu

Streptococcus agalactiae

Patogenita

- Původce novorozeneckých sepsí, meninigitid, pneumonií
  - Časné infekce
    - Vzniká při porodu ještě in utero
    - Při předčasném odchodu plodové vody či průchodem plodu porodním kanálem
    - Projeví se několik hodin či dní po porodu jako bakteriémie, pneumonie, meningitida a/nebo sepse
    - Mortalita 5 %
  - Pozdní infekce
    - Způsobené nejčastěji sérotypem III
    - Projeví se koncem 1 měsíce života pod obrazem sepse a meningitidy
    - Mortalita 10 %

Streptococcus agalactiae

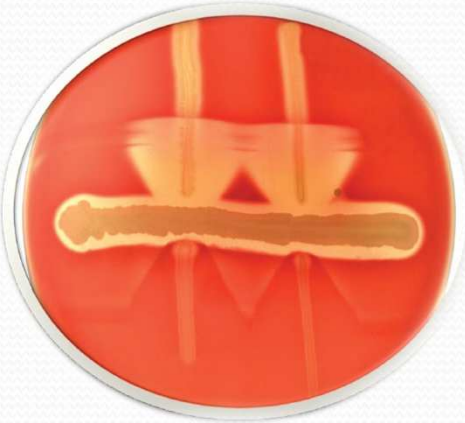
Patogenita

- Původce infekcí těhotných a po porodních infekcí
  - Asymptomatické bakteriurie, amniotitidy, potrat nebo předčasný porod
  - Endometritidy, IMC, raná infekce, bakteriémie (meningitida, abscesy, endokarditida) po porodu
- Ostatní infekce vzácně
  - Především u imunokompromitovaných pacientů
  - Infekce ran, pneumonie, endokarditidy, osteomyelitidy, aj.

Streptococcus agalactiae

Identifikace – kultivace

- Roste dobře na KA
- Na KA s kalnou beta-hemolýzou
  - V okolí zlatého stafylokoka dojde k zesílení zóny hemolýzy - *CAMP test* pozitivní
- Anaerobně tvoří žlutý pigment
- Podmínky kultivace
  - 37 °C 18-24 hod aerobně se zvýšenou tenzí CO_2



Pozitivní (nahoře) a reverzní (dole) CAMPův test

Streptococcus agalactiae

Identifikace - kultivace

Streptococcus agalyctiae
CAMP test

Streptococcus agalactiae

Terapie a prevence

- Terapie
  - Lék volby – penicilin
- Prevence
  - Podání penicilinu rodičce během porodu
  - Screeningové vyšetření
    - Kultivační průkaz výtěru z pochvy/recta v 35. týdnu gravidity