

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

**Určování a diagnostika beta-hemolytických streptokoků v klinické
mikrobiologii**

Bakalářská práce

Autor práce:

Martina Voříšková

Vedoucí práce:

MUDr. Radim Kramář, CSc.

14. 5. 2008

Anotace

The topic Determination and Diagnostics of Beta-Hemolytics Streptococcus in Clinical Microbiology is interesting, actual and above all not so distant from ordinary people 's lives. The encounter of a person with beta-hemolytics streptococci is never pleasant.

The genus of *Streptococcus* includes gram-positive catalase-negative coccus, which rank into pairs and chains and their colonies are also sometimes very small in enriched media. Most of species are selectively anaerobic. This genus includes a large number of species with different significance for people 's disorders, and also the species significant for veterinary medicine. Beta-hemolytic or pyogenic streptococci important in human medicine include first of all streptococci of A and B group. *Streptococcus pyogenes* (A group) is the cause of either localised purulent infections, or invasive and toxic diseases, and also late consequences of these infections. The carrying of beta-hemolytic streptococci of B group (*Streptococcus agalactiae*) is significant especially in pregnant women because it can threaten the mother and the newborn as well. They are the most important causers of newborn meningitis and sepsis.

The aim of the thesis is to find out information of determination and detection methods concerning beta-hemolytic streptococci. It is necessary to devote our attention to each streptococcus and determine its type by cultivation, eventually by further supplementary methods. The main role in diagnostics is played by classical cultivation in common (blood agar) or special enriched media. Each microbiological laboratory chooses its own laboratory procedures. The use of cultivation for capture of beta-hemolytic streptococci and determination of their types by PYR test (for the proof of A group streptococci) and latex agglutination (for confirmation of other groups) seem to be the most convenient. CAMP-test is still the most frequently used method for the proof of group B streptococci. For exclusion of later consequences the assessment of anti-streptolysin O (ASLO) or antideoxyribonuclasis B (ADNB) in serum are often used. The largest percentage representation in the number of diseases in South Bohemian region in 2007 is created by A group (about 50 %) and group B (about 30

%) out of beta-hemolytic streptococci A,B,C,G and F. The data were provided by microbiological laboratory Laboma a.s. (Inc.)

All beta-hemolytic streptococci must be regarded as important pathogens namely in whatever locality, that is why the knowledge of basic and special laboratory methods which lead to identification of particular types of these streptococci is very important for clinical microbiology and the treatment of patients.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Určování a diagnostika beta-hemolytických streptokoků v klinické mikrobiologii** vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce fakultou, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 14. 5. 2008

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat panu MUDr. Radimu Kramářovi, CSc. za odborné vedení mé bakalářské práce, za jeho čas a trpělivost. Dále děkuji pracovníkům mikrobiologické laboratoře LABOMA a. s. a všem, bez jejichž pomoci by tato práce nevznikla.

Obsah

Úvod	8
1. Současný stav	9
1.1. Rod <i>Streptococcus</i>	9
1.1.1. <i>Popis</i>	9
1.1.2. <i>Rozdělení</i>	9
1.2. Beta-hemolytické (pyogenní) streptokoky	11
1.2.1. <i>Streptococcus pyogenes</i>	11
1.2.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
1.3. Ostatní beta-hemolytické streptokoky	25
1.3.1. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	26
1.3.2. <i>Streptococcus equi</i>	27
1.3.3. <i>Streptococcus canis</i>	27
1.3.4. <i>Streptococcus porcinus</i>	27
1.3.5. <i>Streptococcus iniae</i>	28
1.3.6. <i>Skupina Streptococcus anginosus</i>	28
1.3.7. <i>Streptococcus suis</i>	28
2. Cíle práce a hypotézy	30
2.1. Cíle práce	30
2.2. Předpokládané hypotézy	30
3. Metodika	31
3.1. Charakteristika souboru	31
3.2. Určování a diagnostika....	31
3.2.1. <i>Streptococcus pyogenes</i>	31
3.2.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	32
3.2.3. <i>Ostatní beta-hemolytické streptokoky</i>	33
3.3. Základní laboratorní metody	33
3.3.1. <i>Odběr materiálu</i>	34
3.3.2. <i>Zpracování materiálu a</i>	35

3.3.3. <i>Kultivace na půdách</i>	36
3.4. Speciální laboratorní metody	41
3.4.1. <i>PYR-test</i>	41
3.4.2. <i>Bacitracinový test</i>	42
3.4.3. <i>Latexová aglutinace</i>	43
3.4.4. <i>CAMP-test</i>	45
3.4.5. <i>Stanovení ASO (ASLO)</i>	46
3.4.6. <i>Stanovení ADN</i>	49
3.4.7. <i>Biochemický test API 20 Strep</i>	50
4. Výsledky	53
4.1. Základní informace	53
4.2. Vyhodnocení počtu onemocnění	54
4.3. Vyhodnocení počtu onemocnění	56
4.4. Procentuální zastoupení	58
4.5. Interpretace výsledků	58
5. Diskuse	59
5.1. Shrnutí podkladů pro diskusi	59
5.2. Diskuse splnění cílů a hypotéz práce	60
6. Závěr	62
7. Seznam použité literatury	63
8. Klíčová slova	67
9. Přílohy	68
9.1. Grafy	68
9.2. Fotografie	74
9.3. Seznam použitých zkratk	80

Úvod

Téma Určování a diagnostika beta-hemolytických streptokoků jsem si vybrala, protože je to téma zajímavé, aktuální a především ne tak úplně vzdálené od běžného života lidí, nicméně řada z nás si zdaleka nedokáže představit celou problematiku, která s tímto tématem souvisí. Pojem beta-hemolytický streptokok určitě není mezi lidmi tak známý jako třeba angína, s níž se většina lidí bohužel ve svém životě již setkala, a nebylo to nic příjemného.

Je známo, že se jedná o bakterie, jež jsou původci kožních a dýchacích onemocnění člověka a zvířat. Streptokoků je celá řada. Mají kulovitý charakter a dělí se do skupin, které jsou označovány písmeny. Každá z těchto skupin je pro člověka různě nebezpečná. Například beta-hemolytický streptokok skupiny A (*Streptococcus pyogenes*) produkuje erytrogenní toxin a navíc působí spálu a beta-hemolytický streptokok skupiny B (*Streptococcus agalactiae*) u gravidních může infikovat rodícího se novorozence a způsobuje pak těžké až smrtelné meningitidy. Onemocnění způsobená streptokoky skupiny A patří mezi nejčastější bakteriální onemocnění ve světě, zejména jejich respirační klinické průběhy. Všechny beta-hemolytické streptokoky musíme pokládat za závažné patogeny a to v kterékoli lokalitě.

Je třeba věnovat pozornost každému beta-hemolytickému streptokoku a správně určit jeho typ kultivačně, případně dalšími doplňujícími metodami. Dále je důležitý jejich záchyt a především včasné zahájená léčba. Vždy je užitečné znát podrobnosti, proč se daná vyšetření a opatření s tím související provádějí, tak aby pozitivní výsledek kultivace na streptokoka různé skupiny nebyl zbytečným „strašákem“ pro pacienta, ale na druhé straně aby také nebyl tento výsledek zbytečně bagatelizován.

1. Současný stav

1.1. Rod *Streptococcus*

1.1.1. *Popis.*

Do rodu *Streptococcus* (řecky *streptos*, řetěz) náleží grampozitivní kataláza negativní koky, které se řadí do dvojic až řetízků a jejichž kolonie jsou i na obohacených půdách někdy velmi drobné. Většina druhů je fakultativně anaerobních, růst některých je podporován CO₂ (kapnofilní). Konečným produktem fermentace cukrů je kyselina mléčná. Až na výjimky streptokoky nerostou při 10 °C ani při 45 °C, ani v přítomnosti 6,5% NaCl nebo 40% žlučových solí, ani při pH vyšším než 9, nehydrolyzují eskulin a nejsou pohyblivé. Jsou citlivé na vankomycin a mnohé na krevním agaru hemolyzují. Toto všechno jsou faktory, které hrají důležitou roli v diagnostice beta-hemolytických streptokoků. Do tohoto rodu dnes patří velký počet druhů s rozdílným významem pro onemocnění člověka, některé z nich jsou výrazně vázané na člověka. Některé druhy jsou primárně patogenní (*Streptococcus pyogenes*), velkou skupinu tvoří druhy podmíněně patogenní. Setkáváme se s nimi jako s komensály sliznic, jsou součástí normální flóry zejména v dutině ústní, horních cestách dýchacích, mohou kolonizovat sliznici vaginální (*Streptococcus agalactiae*), jsou přítomny v zažívacím traktu. Do rodu *Streptococcus* patří druhy významné pro veterinární medicínu, z nichž některé mohou být také původci onemocnění u člověka. (16, 22)

1.1.2. *Rozdělení.*

Pro klinickou mikrobiologii je užitečné dělit streptokoky podle hemolýzy. Rozeznáváme hemolýzu beta, alfa a gama. Beta-hemolýza se projevuje odbarvením erytrocytů. Pokud dojde zároveň k projasnění půdy v okolí hemolytické kolonie, označuje se hemolýza jako úplná, pokud půda v zóně hemolýzy zůstává zakalená,

nazývá se hemolýza neúplná. Úplnou hemolýzu působí *Streptococcus pyogenes* a beta-hemolytické streptokoky skupin C, G a F, neúplná je typická pro *Streptococcus agalactiae*. Podstatou alfa-hemolýzy neboli viridace (lat. *viridis*, zelený) je změna krevního barviva na zelený verdoglobin. Alfa-hemolýzu streptokoky vyvolávají tvorbou peroxidu vodíku a velice záleží na složení média a atmosféry, jestli se alfa-hemolýza vůbec projeví či nikoliv. V tomto případě pak označíme kmen za gama-hemolytický čili nehemolytický. Alfa-hemolýza je vidět u *Streptococcus pneumoniae* a u skupiny tzv. viridujících streptokoků z dutiny ústní i dalších (např. *S. suis*, *S. anginosus* group apod.). Jak mezi viridujícími, tak beta-hemolytickými streptokoky se vyskytují kmeny nehemolytické, nejvíce ve skupině *Streptococcus bovis*. Toto je tedy jedno ze základních kritérií, o které se klasifikace streptokoků opírá – dle typu změn na krevním agaru.

Dále je to dělení dle biochemických a fyziologických charakteristik. Sem patří zejména znaky sloužící k rozlišení streptokoků, to jsou velikost kolonií a některé biochemické testy. Důležitým kritériem sérologického třídění streptokoků je přítomnost skupinově specifického polysacharidu C. Ten se prokazuje u beta-hemolytických streptokoků, naopak chybí pneumokokům a mnoha viridujícím streptokokům. Ne všechny druhy streptokoků tento antigen tvoří. Je-li polysacharid C přítomen, pak umožňuje rozlišit antigenní skupiny A-Z dle Lancefieldové. Lékařsky významné streptokoky obsahují antigeny A (*S. pyogenes*), B (*S. agalactiae*), C (*Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* a *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*), D (*S. bovis*), G (*S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*) a další. Posledním kritériem je patogenní působení a místo výskytu, které umožnilo rozdělení streptokoků na pyogenní (kam se řadí zejména *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. equi*, *S. equisimilis*, streptokoky skupiny L, G - velké kolonie a *S. pneumoniae*), na streptokoky ústní (skupina se v podstatě kryje s označením streptokoky viridující), na enterokoky (pro něž byl vytvořen samostatný rod *Enterococcus*) a na laktokoky (sérologická skupina N). V poslední době se užívá dělit streptokoky jen na beta-hemolytické (nazývané souhrnně též pyogenní) a non-beta-hemolytické nebo též non-hemolytické. V tomto pojetí se k posledním řadí rovněž alfa-

hemolytický *S. pneumoniae* neboli pneumokok a – obvykle alfa-hemolytické – streptokoky viridující neboli ústní. (7, 16, 33)

1.2. Beta-hemolytické (pyogenní) streptokoky

Mezi beta-hemolytické neboli pyogenní streptokoky důležité v humánní medicíně patří především druhy *S. pyogenes* a *S. agalactiae*. Dále jsou pro člověka patogenní *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* a druhy skupiny *Streptococcus anginosus*. *S. equi* ssp. *zooepidemicus*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus porcinus* a *Streptococcus iniae* jsou primárně zvířecí druhy, ale mohou vyvolat onemocnění i u člověka. Pouze pro zvířata jsou patogenní *Streptococcus equi* ssp. *equi*, *Streptococcus phocae* a *Streptococcus didelphis*. (33)

1.2.1. *Streptococcus pyogenes*.

Streptococcus pyogenes (v anglosaské literatuře označovaný též zkratkou GAS, *group A streptococcus*) spolu s pneumokokem patří k nejzávažnějším lidským patogenům z rodu *Streptococcus*. Je to beta-hemolytický streptokok, patří do skupiny A podle stěnového antigenu, který obsahuje N acetylglukosamin a ramnózu. Je primárně patogenní pro člověka a člověk je jediným přirozeným zdrojem infekce. Infekce vyvolané *S. pyogenes* se vyskytují po celém světě, v mírném pásmu převažují infekce respiračního traktu, v teplých oblastech jsou častější infekce kožní. *S. pyogenes* je původcem faryngitid, spály, infekcí kůže a podkoží (pyoderma, erysipel), systémových infekcí, streptokokového toxického šoku a poststreptokokových následků. (1, 7)

Morfologie. Jde o grampozitivní, pravidelně kulaté až lehce ovoidní koky o průměru 0,6 až 1,0 μm . Jsou uspořádány do dvojic až řetízků, velmi dlouhé řetízky se tvoří po delší inkubaci v tekutých kultivačních půdách. Některé kmeny jsou vybaveny pouzdrem z kyseliny hyaluronové. (33)

Fyziologie. *S. pyogenes* je fakultativní anaerob, katalasa i oxidasanegativní. Hlavním produktem jeho metabolismu je kyselina mléčná. Zahubí ho teplota 60 °C během 30

minut. Poměrně dobře snáší vyschnutí a lépe než stafylokoky odolává nízkým koncentracím violeti a soli thalia. (13)

Kultivace. *S. pyogenes* patří mezi růstově náročné bakterie, roste na komplexních kultivačních půdách. Pro záchyt se užívá krevní agar s beraní krví, přítomnost CO₂ růst podporuje. Na obyčejném živném agaru a v živném bujonu roste velmi špatně. V tekutých půdách tvoří sediment, půda nad ním může být zcela čirá. Přídavek glukosy (např. v Toddově-Hewittově bujonu) sice podněcuje růst, půda s glukosou se ale může natolik okyselit, že ve starších kulturách mohou streptokoky uhynout. Kolonie *S. pyogenes* na krevním agaru jsou drobné, většinou lesklé, kolem 0,5 mm v průměru, a bývají obklopeny dobře ohraničenou zónou úplné beta-hemolýzy. V mukoidní fázi vznikají kolonie o něco větší s nápadně hlenovitým povrchem, bakterie v této fázi tvoří pouzdro. Hemolýza je výraznější při nižším pH a nižší tenzi kyslíku (což se docílí vpichem do agaru), naopak ji potlačuje přítomnost redukujících cukrů v médiu. (1, 33)

Biochemické vlastnosti. *S. pyogenes* je homofermentativní – z glukózy tvoří kyselinu mléčnou, netvoří katalázu, produkuje acetoin z glukózy, amoniak z argininu a hydrolyzuje hipurát a eskulin. Nefermentuje na rozdíl od ostatních pyogenních streptokoků ribózu. (1, 13)

Antigenní struktura. Antigenní struktura bakteriální buňky *S. pyogenes* byla velmi podrobně studována ve snaze najít struktury důležité pro patogenitu, a to zejména pro vznik imunopatologických následků streptokokových nákaz. Z buněk lze extrahovat skupinově specifický polysacharid C, na jehož podkladě se *S. pyogenes* řadí do skupiny A podle Lancefieldové. Z bílkovinných povrchových antigenů jsou významné zejména proteiny M, T, R a proteiny blízké M-proteinu (tzv. SOF-sérový opacitní faktor). Bílkovinné antigeny se využívají k poddruhové identifikaci. Pro předběžné zařazení antigeny T a R, pro typizaci antigen M a SOF. SOF je lipoproteína působící opacitu (kalení) séra. Protilátky proti SOF jsou typově specifické a korelují s M-typem. Na základě antigenní struktury proteinu T se rozeznává jiných 25 typů, které mají rovněž určitý vztah k M-typům. Typizace je důležitá epidemiologicky při vyšetřování výskytu streptokokových onemocnění, kde nelze určit M-typ. Nejmodernější typizační postupy jsou molekulárně biologické. (1, 13, 33)

Streptokoková laboratoř v USA vyvinula novou molekulární metodu typizace streptokoků skupiny A, emm typizaci. Vznikl podnět, aby tato nová metoda typizace byla srovnávána s klasickými sérologickými typizačními metodami na referenčních typových kmenech streptokoků skupiny A. V článcích byly prezentovány první výsledky charakterizace invazivních kmenů *Streptococcus pyogenes*, izolovaných v České republice, metodou multilokusové sekvenační typizace (MLST). Výsledky MLST ukazují, že populace kmenů způsobujících závažná onemocnění v ČR je odlišná od kmenů izolovaných v zahraničí. MLST je jednou z metod molekulární epidemiologické analýzy patogenů. Sekvenční typy (ST) jsou mezinárodně srovnatelné a umožňují provádění globální molekulární epidemiologie. MLST navíc poskytuje 100 % typovatelnost kmenů. (17, 25)

M-protein je vláknitá struktura vyčnívající z bakteriální stěny, proniká pouzdrem a je kotven v buněčné membráně. Vlákno se skládá ze dvou spirálovitě svinutých řetězců s karboxyterminálními konci. Je známo více než 80 antigenních specifit M-proteinu. Jednotlivé specifity se liší strukturou koncové hypervariabilní části, hlubší struktura je společná. M-protein je hlavním antigenem určujícím virulenci kmenů *S. pyogenes*. Kmeny bez M-proteinu jsou nevirulentní. M-protein umožňuje adhezi bakterie na povrch sliznic a po průniku chrání bakterii před fagocytózou. Na vlákne M-proteinu jsou místa, na něž se váže regulační faktor komplementu H a fibrinogen. Složení volného aminoterminálního konce M-proteinu je velmi variabilní. Na podkladě jeho antigenní stavby se rozeznává více než 100 sérotypů, vůči nimž existuje typově specifická imunita daná přítomností opsonizačních protilátek. M-protein je tudíž zároveň hlavním protekčním antigenem. Některé M-sérotypy vyvolávají spíše infekce nosohltanu (M1, 3, 4, 12), jiné pak infekce kůže (M2, 49 aj.), některé mají vztah k revmatické horečce (M1, 3, 5, 16), jiné k akutní glomerulonefritidě (M2, 49, 55, 57). Prevalujícími sérotypy u sepse, septických a toxických šoků, které jsou většinou doprovázené závažnými a rozsáhlými infekcemi hlubokých měkkých tkání, jsou M1 a M3. Protilátky proti M-proteinu jsou protektivní a typově specificky chrání před reinfekcí stejným typem. M-protein je tvořen také L formami streptokoků. Kyselina lipoteichoová se podílí spolu s M-proteinem na adhezenci. Proti lipoteichoové kyselině

se tvoří protilátky, které mohou zkříženě reagovat s podobnými chemickými strukturami buněčných membrán eukaryotických buněk i s kardiolipinem. Protilátky proti lipoteichoové kyselině blokují adhezi streptokoků k buňkám ústní sliznice. Cytoplazmatická membrána obsahuje řadu antigenních determinant, které jsou analogické komponentám srdeční tkáně a chlopní. F-protein je nositelem receptoru pro fibronectin, který je součástí povrchu eukaryotických buněk. Je pravděpodobné, že se podílí na vazbě streptokoků na epiteliální buňky faryngu a kůže. Důležitým faktorem virulence je bakteriální pouzdro pyogenních streptokoků tvořené kyselinou hyaluronovou, které je pro člověka neantigenní. Imunitní systém ho pokládá za tělu vlastní strukturu (kyselina hyaluronová je normální součástí savčí pojivové tkáně). Brání opsonizaci, chrání bakterii před fagocytózou, nicméně více se v tomto směru uplatňuje M-protein, jež je hlavním faktorem virulence *S. pyogenes*. Ten působí antifagocytárně a adhezenčně. (7, 13, 22, 33)

Extracelulární produkty významné pro patogenitu. *S. pyogenes* může tvořit pyrogenní toxiny několika typů o malé molekulové hmotnosti (13 000 – 25 000). Produkce toxinů typu A a C je vázána na lysogenní konverzi, tj. informace (gen) je do buňky přinášena prostřednictvím DNA temperovaného bakteriofága. Dříve se exotoxiny SpeA a SpeC (streptokokové pyrogenní exotoxiny) nazývaly souhrnně spálový neboli erytrogenní Dickův toxin. Spe účinkují jako superantigeny: spojí molekulu MHC II na buňkách prezentujících antigen (APC) s receptorem T-lymfocytů, uvolní se cytokiny, následuje horečka a aktivace komplementu a systémů srážlivosti a fibrinolýzy. Výsledkem je syndrom streptokokového toxického šoku. Biologické vlastnosti superantigenu jsou zejména: 1. pyrogenita, 2. uvolňování cytokinů z cílových buněk (II 1, II 2, II 4, II 6, II 8, II 10, TNF alfa, beta) a dalších zánětlivých mediátorů (leukotrienů), 3. zvýšená citlivost k endotoxinu, 4. suprese tvorby protilátek, 5. indukce tolerance, alergie, apoptózy a delecce receptorů T-lymfocytů. Gen pro toxin typu B je chromosomální, je přítomen ve všech buňkách a jeho produktem je cysteinová proteasa účinkující jako průnikový faktor. Gen pro typ A je vázán zejména na M1 a M3 typ *S. pyogenes*. Pyrogenní toxin je spojován se vznikem spálového exantému, i když mechanismus jeho vzniku nebyl přesně analyzován. Ze starších pozorování bylo známo,

že u vnímavého jedince (který neměl protilátky proti erytrogennímu toxinu) je možno intradermální aplikací erytrogenního toxinu vyvolat lokální reakci (erytém-Dickova zkouška). Naopak podání protilátky do místa se spálovým exantémem vede k vyblednutí (Schulz-Charltonova reakce). Tyto reakce podporují představu, že na vzniku spálového exantému se podílí přímé působení toxinu (na kapiláry). Vedle tohoto přímého účinku se pravděpodobně na vzniku exantému podílí lokální projevy přecitlivělosti oddáleného typu.

Z extracelulárních faktorů virulence jsou nejznámější hemolysiny. Streptolysin O patří do rodiny oxygenlabilních hemolysinů, je účinný pouze v redukované formě, je aktivován sulfhydrylovými skupinami. Oxidovaná forma se neváže na buněčný povrch. Nevvolává intravaskulární hemolýzu, neboť jeho aktivita je v plazmě blokována. Váže se v aktivované formě na cholesterol v buněčné membráně, a to erytrocytů, leukocytů, krevních destiček, ale i jiných buněk, destruuje cytoplazmatickou membránu a buňky usmrcuje. Má kardiotoxické vlastnosti, pokusná zvířata po intravenózním podání končí smrtí. Je antigenní, tvoří se proti němu protilátky. Komplexy O streptolysinu s protilátkou je možno prokázat v srdci při revmatické horečce. Streptolysin S vyvolává na krevním agaru zónu úplné hemolýzy. Odpovídá za smrt leukocytů, které fagocytovaly pyogenní streptokoky. Je pravděpodobně složen z aktivní komponenty a přirozeného nosiče v cytoplazmatické membráně. Je neantigenní. Působí poruchy permeability membrán, v buňkách atakuje intracelulární orgány (mitochondrie). Hyaluronidáza usnadňuje pronikání streptokoků tkáněmi štěpením mezibuněčného tmele. Je schopna štěpit i kyselinu hyaluronovou streptokokového pouzdra. Je antigenní. Streptokinázy (A a B) jsou aktivátory fibrinolytického systému. Jejich účinkem vzniká z plasminogenu plasmin. Aktivovaný enzym působí na komplementový systém, uvolňuje chemotaktické faktory, zvyšuje permeabilitu a aktivuje kininové systémy (napomáhají šíření streptokoka v zánětlivé tkáni). Využívají se terapeuticky pro rozpouštění krevních sraženin (u srdečního infarktu, venózních trombóz). Deoxyribonukleasa depolymerizuje deoxyribonukleovou kyselinu uvolněnou z rozpadlých buněk, zejména leukocytů. Neporušené buňky neatakuje. Jsou známy 4 antigenní typy, nejčastější je typ B. Proteinázy štěpí in vitro bílkoviny. Působí

synergicky se streptolysinem O. V pokuse vyvolávají ohraničené nekrózy v srdci, tvorbu verukózních změn na chlopních a vznik granulomatózních reakcí s obrovskými buňkami. Jsou antigenní, protilátky neutralizují jejich enzymovou aktivitu. Biologicky aktivních produktů a komponent byla prokázána celá řada, jsou známy jejich účinky v experimentu, ale jejich konkrétní podíl v patogenezi lidských onemocnění není dosud podrobně prostudován. Nepochybně však je virulence určována hlavně M-proteinem, pyrogenními toxiny a lipoteichoovou kyselinou. (1, 7, 13, 33)

Imunita. Ochranu proti streptokokovým nákazám poskytují především protilátky proti M-proteinu. Z toho protilátky IgA brání adhezenci streptokoků na epithelie a kolonizaci sliznic. Protilátky IgG opsonizují a zamezují tak invazi do tkání a množení streptokoků v krvi. Ochranný účinek byl prokázán i u protilátek proti dalším povrchovým molekulám a proti C5a-peptidase. Protilátky proti streptokokovým pyrogenním exotoxinům A, B a C chrání jen proti vzniku spálového vyrážky, nikoli proti vzniku anginy a proti syndromu toxického šoku. Částečná ochranná role se zdá patřit i T-buněčné imunitě. Imunita je přísně typově specifická, proto lze streptokokovou angínou onemocnět opakovaně, a to i po infekci stejným typem, pokud byla antibiotická terapie zahájena včas a protilátky proti M-proteinu se nestačily vytvořit. (13, 22, 33)

Patogeneze onemocnění u člověka. Bezpříznakové nosičství u dětí a mladých dospělých je časté, zpravidla však přechodné, dlouhodobá kolonizace je částečně limitována produkcí protilátek proti M-proteinu (přítomnost typově specifické protilátky nevede ihned k eliminaci streptokoka) a omezována normální flórou, zejména viridujícími a gama streptokoky (kompetice o receptory, produkce bakteriocinů). Onemocnění vzniká při infekci kmenem, proti němuž nemá hostitel protilátky. Faktory patogenity, v první řadě M-protein, ale také lipoteichoové kyseliny a F-protein umožní streptokokům adhezi na buněčné povrchy. Tento krok je významný u streptokokových faryngitid. Při průniku streptokoka do tkáně se uplatňují antifagocytární vlastnosti pouzdra a M-proteinu, k šíření přispívají streptokokové exoenzymy (streptokináza, hyaluronidáza). Zánětlivá odpověď je místní a v regionálních uzlinách. Pokud infikující kmen je producentem erytrogenního toxinu a hostitel proti jeho antigenu nemá

protilátky, může vzniknout spála se svým typickým exantémem. V poslední době se znovu objevují invazivní typy onemocnění, jejichž vznik je patrně spojen s dlouhodobým posunem ve výskytu M typu (k M 1, M3, M 18) a kmenů s vyšší virulencí. Pokud hostitel nemá specifickou imunitu proti danému typu M-proteinu, je dán předpoklad k množení streptokoků a produkci jeho toxinů a enzymů. Produkce pyrogenního toxinu (především typu A a B), pokud není neutralizován protilátkou, vede k uvolnění lymfokinů a cytokinů z imunocytů, jejichž působení spolu s dalšími produkty streptokoka může vést jednak k prohloubení zánětu a rychlému šíření infekce s rozpadem tkáně, jednak k příznakům toxického šoku s hypotenzí a multiorgánovým selháním.

Se streptokokovými nákazami jsou spojena onemocnění označovaná jako sterilní následky. Jejich vznik je v příčinné souvislosti s infekcí *S. pyogenes*, ale v patologických změnách už streptokok není přítomen. Sterilní následky tvoří 3 samostatné jednotky, revmatická horečka, poststreptokoková glomerulonefritida a chorea minor. Patogeneze je složitá, nejpravděpodobněji se na ní podílejí 1. přímé účinky streptokokových produktů (streptolysin O a S, streptokináza), 2. antigenní podobnost buněčných složek *S. pyogenes* s tkáněmi hostitele (zejména myokardu a srdečních chlopní), 3. imunologické mechanismy (ukládání komplexů antigenu a protilátky, buněčná přecitlivělost, streptokokovými antigeny navozená autoimunita). Mezi akutní fází infekce a rozvojem sterilních následků probíhá fáze latence. Poststreptokokové následky jsou spojeny s dlouhodobou perzistencí streptokokových antigenů zejména u neléčených infekcí. Imunologickou hypotézu vzniku sterilních následků podporují sérologické nálezy protilátek proti některým streptokokovým antigenům (SLO, deoxyribonukleasa aj.). (1, 7, 13, 15, 33)

Patogenita. *S. pyogenes* je příčinou jednak lokalizovaných hnisavých infekcí, jednak invazivních až toxických onemocnění a konečně tzv. pozdních následků těchto nákaz. Nejběžnějším streptokokovým onemocněním hnisavého rázu je akutní tonsilofaryngitida, u nás tradičně označovaná termínem angína. Na etiologii akutních angín se podílí řada bakterií (např. streptokoky skupiny A, *Corynebacterium diphtheriae*, pneumokok, *Branhamella, borelie*) a virů (např. adenoviry, coxsackieviry,

rhinoviry, RS-virus, virus Epsteina-Barrové aj.). U virových infekcí jsou tonzily většinou zvětšené a zarudlé, kromě toho bývá současně často konjunktivitida a rinitida. Klinické rozlišení virové a bakteriální tonsilitidy je prakticky nemožné, i když pro streptokokovou tonsilofaryngitidu je charakteristická stejnoměrně šarlatově zbarvená a zduřelá sliznice tonzil až celého faryngu a nepřítomnost rýmy a kašle. Pro virovou etiologii svědčí spíše skvrnitý charakter zanícené sliznice patra a hltanu (tzv. Hynkova kropenatá faryngitis). Dále je typické zvětšení lymfatických folikulů, zřetelné postižení spojivek, vyskytují se i povlázky na patrových mandlích, převládají celkové příznaky (horečka, únavnost, bolesti svalů). (1, 24, 36)

Angína postihuje hlavně děti školního věku, obvykle na podzim a v zimě. Pokud kmen produkuje pyrogenní exotoxiny, k příznakům angíny se přidává typická vyrážka a malinový jazyk a onemocnění se nazývá spála (skarlatina). Komplikace angíny a spály mohou být hnisavé (peritonsilární nebo retrofaryngeální absces, otitis media aj.), vzácně toxické (syndrom streptokokového toxického šoku), případně vzniknou níže uvedené následky. Kožní hnisavé infekce neboli obecně pyodermie jsou obvykle vyvolány jinými M-sérotypy, vyskytují se většinou v létě, jsou vysoce nakažlivé a z pozdních následků po nich nevzniká revmatická horečka, ale akutní glomerulonefritida. Zcela povrchovou infekcí epidermis u malých dětí je impetigo – žlutým hnisem naplněné nebolestivé puchýře a zasychající strupy. Spolu s pyogenním streptokokem, ale i samotný se zde může uplatnit též *Staphylococcus aureus*. I po nepatrném narušení pokožky mohou streptokoky proniknout hlouběji, vznikne ostře ohraničený zánět zvaný růže (erysipelas). Erysipel se vyskytuje obvykle na bérkách nebo v obličeji. Zánět podkoží se nazývá cellulitis a má sklon se šířit. Rovněž streptokokové hnisání ran má tendenci se šířit, například do regionálních mízních uzlin v podobě rudých pruhů prozrazujících pod pokožkou probíhající lymphangoitis. Následující zánět mízních uzlin bývá hnisavý (lymphadenitis suppurativa). K hlubokým streptokokovým infekcím patří invazivní se šířící nekrotizující fasciitis, epifasciálně uložená phlegmona nebo subfasciálně probíhající myositis či myonecrosis. Pyogenní streptokoky mohou dále vyvolat i pneumonii nebo meningitidu. Purulentní meningitida vyvolaná pyogenním

streptokokem je onemocněním vzácným, naštěstí lze předpokládat u běžné antibiotické terapie purulentních meningitid dostatečnou účinnost i na tohoto patogena. (19, 23, 24)

U hlubokých, invazivních a komplikovaných streptokokových infekcí hrozí vysoké nebezpečí vzniku sepse. Ještě před 100 lety mívala vysokou smrtelnost poporodní sepse (sepsis puerperalis, horečka omladnic), kdy se pyogenní streptokoky zavedené rukama porodníka do porodního kanálu dostaly do dutiny děložní a pak jim nestálo nic v cestě a ranou po odloučené placentě pronikly do krve a množily se v ní. Bakteriémie a nekrotizující fasciitida jsou v posledních letech často provázeny syndromem podobným toxickému šoku (TSLs, z angl. toxic shock-like syndrome, též syndrom streptokokového toxického šoku) známému u stafylokoků. Vyznačuje se zánětem měkkých tkání a nápadnou bolestivostí v místě infekce, horečkou, nauseou, průjmy a příznaky šoku. Mezi pozdní následky streptokokových nákaz náleží revmatická horečka a akutní glomerulonefritida. K jejich vzniku je nezbytná jak předchozí infekce vyvolaná *S. pyogenes*, tak vliv prostředí, které umožňuje opakovanou expozici vůči streptokokovým infekcím, a především genetická dispozice nemocného, kdy se rýsují určité vztahy mezi jistými fenotypy systému MHC a vnímavostí ke vzniku revmatické horečky. Mezi genetické předpoklady patří defekty lokální imunity, větší prostupnost tkání pro cytotoxiny a stěnové komponenty a poruchy degradace streptokokových složek. Rvmatická horečka (febris rheumatica) se projevuje jako horečnatý nehnisavý zánět srdce (s postižením endokardu, myokardu a hlavně mitrální chlopně) a kloubů (stěhovavá arthritida více kloubů), vzácněji centrálního nervového systému (chorea minor, posunčina) a kůže (erythema marginatum). Dostavuje se za několik týdnů po streptokokové angíně, je provázena celkovými známkami zánětu (zvýšená sedimentace, zvýšená hladiny C-reaktivního proteinu) a zvýšenou a neklesající hladinou protilátek proti streptokokovým antigenům, například antistreptolysinu O (ASLO), anti-DNasy apod. (13, 24, 33, 36)

Předpokládá se, že streptokoky indukují tvorbu protilátek proti antigenům pouzdra, buněčné stěny a cytoplazmatické membrány. Tyto protilátky jsou namířeny např. vůči myosinu, lamininu nebo keratinu. Rvmatická horečka se vyskytuje častěji po infekci některými sérotypy, tzv. „revmatogenními“, jako jsou M1, 3, 5, 16 a 18. Tyto

kmeny nemívají opacitní faktor a vyrůstají v mukoidních koloniích. Akutní glomerulonefritida se dostavuje po infekci tzv. „nefritogenními“ typy, z nichž typy M2, 49, 55, 57 a další vyvolávají spíše pyodermie, typy M1, 4, 12 a 25 angíny. Ačkoli byly popsány zkřížené sérologické reakce mezi nefritogenními kmeny a tkání ledvin, zdá se, že u poststreptokokové glomerulonefritidy jsou chorobné změny vyvolány usazováním imunitních komplexů v glomerulech. (1, 15,19)

Terapie. Důležitým cílem terapie je zabránit vzniku revmatické horečky, respektive glomerulonefritidy. *S. pyogenes* je citlivý na penicilin, tudíž je stále lékem první volby. Včas zahájená léčba penicilinem sice může zamezit vzniku imunitní reakce vůči streptokokům, současně ale zabrání vzniku pozdních následků. Lokální antibiotika jsou neúčinná (navíc nebezpečí alergizace). Lékař by měl dávat pozor na ampicilin u infekční mononukleózy. V případě běžných angín se předpokládá, že penicilin rozložil v tonzilách přítomné mikroorganismy produkující beta-laktamasu, například *Staphylococcus aureus* nebo *Bacteroides fragilis*. U těžkých streptokokových nákaz množství streptokoků ve tkáni může dosáhnout hladin, při nichž se streptokoky přestávají množit a vytvářet penicilinvázející proteiny, čímž vnímavost vůči účinku penicilinu rapidně klesne. Dalším důvodem možného selhání penicilinu je schopnost streptokoků přežít uvnitř epithelií respiračního traktu, do nichž penicilin neproniká. Dosud nebyl zachycen kmen rezistentní k penicilinu, i když z některých zemí jsou hlášeny náznaky zvyšování minimálních inhibičních koncentrací. To se považuje za indicii rozvoje relativní rezistence. Důsledná a dostatečně dlouhodobá terapie akutních infekcí, zejména faryngitid, je nutná pro prevenci sterilních následků. Alternativní antibiotická léčba je nutná u nemocných s přecitlivělostí k penicilinu. Pak se u citlivých kmenů užívají makrolidy nebo tetracyklin. Vůči tetracyklinům bývá většina kmenů *S. pyogenes* rezistentní, sulfoamidy a kotrimoxazol zase nejsou schopny spolehlivě zamezit vzniku pozdních následků. Pokud nelze podat penicilin např. pro prokázanou alergii, užívají se makrolidy.

Od roku 1989 se začíná sledovat rezistence *S. pyogenes* k erytromycinu (který reprezentuje bez výjimky všechna makrolidová antibiotika). Předběžné výsledky ukazují na prudký vzestup rezistence k těmto antibiotikům, jenž má velmi

pravděpodobně souvislost s vysokou spotřebou makrolidových antibiotik. Rezistence nemusí být v plné šíři klinicky zaznamenána, protože většina infekcí má mírný průběh, jejich vyléčení je spontánní a podání neúčinného antibiotika se obvykle neprojeví. Rezistence k makrolidům má však závažný význam při léčbě celkových infekcí způsobených *S. pyogenes*. Například ve Finsku je rezistence k erytromycinu přes 40 %, poměrně vysoká je i ve Francii a Španělsku. V České republice je v průměru 5 %. Za časově omezené období (říjen – prosinec 1996, 1997 a říjen 1998 – leden 1999) se prokázal dvojnásobný vzestup průměrné rezistence k erytromycinu (a k ostatním makrolidům) v ČR z 3,7 % v roce 1996 na 7,3 % v posledním období. Ve všech třech sledovaných obdobích byla nejvyšší a vzrůstající průměrná rezistence v oblasti Prahy (5,6 %, 5,1 %, 9,8 %) a jižní Moravy (5,1 %, 4,5 %, 9,1 %), nejvyšší vzestup rezistence z 1,5 % v prvním období na 9,1 % v posledním období byl pozorován v oblasti východních Čech. V sledovaném období let 1997 a 1998 – 1999 byla pozorována vyšší rezistence k erytromycinu u kmenů izolovaných ze vzorků hnisu při celulitidě (7,3 % a 10 %) než u kmenů izolovaných z krku při tonzilitidě (2,7 % a 7,3 %). Tyto výsledky dokládají nezbytnost aktivní surveillancie rezistence *S. pyogenes* k erytromycinu a omezení preskripce makrolidů pouze na případy, ve kterých mají plně zdůvodněné oprávnění. U jiné studie se mimo výskytu rezistence v regionu Praha 5 a 13 zjišťoval i průkaz fenotypů a mechanismus rezistence. Převažujícím mechanismem rezistence vybraných kmenů byl aktivní efflux s charakteristickým fenotypem M a většina pacientů s pozitivním izolátem rezistentního kmene spadala do věkové kategorie mezi 5 – 15 lety. Velké rozdíly ve výskytu rezistentních kmenů jsou podmíněny různými preskripčními zvyklostmi jednotlivých praktických lékařů. Šíření rezistentních kmenů může být také ovlivněno jejich přenosem v dětských kolektivech. Řešení problému je třeba hledat v cíleném omezení spotřeby makrolidových antibiotik na nezbytné indikace. (1, 7, 12, 31, 32)

Užitečné k eradikaci faryngálního nosičství se ukazují být linkosamidy. Klindamycin se doporučuje při léčbě syndromu toxického šoku spolu s terapií protišokovou, u těžkých invazivních forem s nekrózou měkkých tkání až nekrotizující fasciitidou je nutná také intervence chirurga. Převážná část kmenů rezistentních

k erytromycinu je současně rezistentní ke klindamycinu. Rezistenci k těmto antibiotikům je nezbytné dále sledovat, protože velmi rychle vzniká a šíří se v prostředí selekčního tlaku makrolidových antibiotik, která jsou pro své široké spektrum oblíbenou a často nezdůvodněnou první volbou pro léčbu respiračních infekcí v komunitě. (1, 15)

Prevence. Specifická prevence aktivní imunizací se dosud neprovádí. Při riziku vzniku revmatické horečky (eventuelně její recidivy) se doporučuje preventivní podávání penicilinu. Pro očkovací látku se předpokládá využití M-proteinu. Vakcína by musela být polyvalentní tj. obsahovat typy, které jsou v dané oblasti prevalentní (s možností reagovat na změnu typů). Pro nízkou imunogenost M-proteinu by bylo nutno užít vysokých dávek antigenů s přidáním adjuvans. Vlastnosti M-proteinu (navození časně a pozdní přecitlivělosti, podobnost s hostitelskými antigeny) vyhlídky očkovací látky snižují. (1)

1.2.2. *Streptococcus agalactiae*

Patří mezi beta-hemolytické (výjimečně některé kmeny nehemolyzují nebo vyvolávají viridaci) pyogenní streptokoky se skupinovým antigenem B. Název *Streptococcus agalactiae* se v anglicky psané lékařské literatuře téměř nepoužívá a tyto streptokoky jsou označovány jako group B streptococci (GBS). Důvodem možná je, že termín „agalactiae“ odráží situaci ve veterinárním lékařství, zvířecí kmeny vyvolávají u krav mastitidu spojenou se ztrátou tvorby mléka. Bovinní kmeny jsou však od kmenů izolovaných od člověka odlišné. U člověka je také příčinou závažných onemocnění, zejména novorozenců. (7, 33)

Morfologie. Mikroskopicky nelze *S. agalactiae* odlišit od ostatních beta-hemolytických streptokoků, i když v tekutých médiích jeho dlouhé řetízky někdy vypadají, jako by byly složeny ze dvojic koků. (33)

Fyziologie a kultivace. Na krevním agaru vyrůstá v koloniích mnohem větších než *S. pyogenes*, mazlavých, obklopených úzkou zónou neostře ohraničené, neúplné (kalné) beta-hemolýzy. V sousedství zlatého stafylokoka je tato hemolýza nápadně zesílená (pozitivní CAMP-test), protože tzv. CAMP-faktor *S. agalactiae* se váže na

membránu erytrocytů narušenou stafylokokovou sfingomyelinasou C, což vede k rozpadu erytrocytů. Malé procento kmenů nehemolyzují, pozitivitu v CAMP-testu si však zachovává. V přítomnosti škrobu a za anaerobních podmínek tvoří většina kmenů oranžový pigment. Mnohé kmeny rostou v přítomnosti žluče a všechny hydrolyzují hippurát sodný. PYR-test a eskulin jsou na rozdíl od enterokoků negativní. Většina kmenů je rezistentní na bacitracin. (18, 33)

Antigenní struktura. Vedle skupinově specifického stěnového antigenu B je možno prokázat typově specifické pouzderné polysacharidové antigeny, které jsou protektivními antigeny. Podle pouzderných polysacharidových antigenů (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI) a proteinových antigenů (R, X) je možno rozlišit celkem 10 sérologických typů. Jejich rozlišení je významné pro epidemiologii. Pro člověka jsou nejdůležitější sérotyp III, který převažuje u novorozenců se sepsí nebo meningitidou, a typ V, neboť více než polovina kmenů je rezistentních k erytromycinu. (1, 7, 33)

Patogeneze. Zatím jediným známým faktorem virulence je pouzdro, které u sérotypu III obsahuje kyselinu N-acetylneuraminovou (sialovou). Tato molekula brzdí aktivaci komplementu alternativní drahou a fagocytózu. Asi u čtvrtiny těhotných streptokoky skupiny B kolonizují střevo a vaginu, asi v polovině případů se během porodu mohou přenést na novorozence a z nich asi 2 % onemocní. (18, 33)

Patogenita. *S. agalactiae* může být prokázán na tonsilách, v respiračním traktu, v zažívacím traktu a ve vagině, kde může kolonizovat sliznici, aniž by vyvolával klinické příznaky onemocnění. Významné je nosičství zejména u těhotných, neboť může ohrozit rodičku, ale zejména novorozence. Kolonizováno je 15 – 30 % gravidních žen. Novorozenec se nakazí v průběhu porodu (poraněním, aspirací, polknutím kontaminovaného vaginálního sekretu). Riziko onemocnění zvyšuje přítomnost jednoho a více rizikových porodnických faktorů (předčasný porod, předčasná a dlouhotrvající ruptura membrány, horečka během porodu, předchozí sourozenec s invazivní infekcí vyvolanou *S. agalactiae*, vícečetné těhotenství, masivní kolonizace matky a absence skupinově specifických protilátek matky). Streptokoky skupiny B jsou tedy nejdůležitější původci novorozeneckých infekcí, meningitid a sepsí, tato onemocnění jsou dvojího typu: časná a pozdní s incidencí 2 – 3,7/1000 živě narozených dětí,

s mortalitou 19 % a zejména neurologickými následky u přibližně 44 % dětí narozených v 34. týdnu těhotenství. Mortalita a následky jsou podstatně vyšší u dětí narozených před 34. týdnem těhotenství. Časně infekce vznikají během porodu ještě *in utero* při předčasném odtoku plodové vody nebo až při průchodu plodu porodním kanálem a projeví se během prvních hodin a dní po narození. (18, 26)

Spektrum onemocnění zahrnuje bakteriémií, pneumonii, meningitidu a septický šok, mortalita je kolem 5 %, na životě jsou daleko více ohroženi nezralí novorozenci. Pozdní infekce jsou vyvolány většinou sérotypem III, dostavují se obvykle koncem prvního měsíce života, v polovině případů se dítě nakazí až po porodu. Onemocnění probíhá pod obrazem sepse a meningitidy se smrtností 10 %. Streptokoky skupiny B jsou významnými původci komplikací v šestinedělí (endometritidy, infekce močových cest, bakteriémie po císařském řezu vedoucí k endokarditidě, k meningitidě, ke tvorbě abscesů). U kojenců jsou streptokoky skupiny B nejčastější příčinou osteomyelitid. U starších dětí a dospělých působí především cystitidy a pyelonefritidy. Ostatní typy infekcí vyvolává *S. agalactiae* hlavně v případech s podlomenou obranyschopností – pneumonie, endokarditidy, hnisavé arthritidy, infekce ran, osteomyelitidy, vzácně i meningitidy. Jeho podíl na faryngitidách zdaleka nedosahuje podílu *S. pyogenes* a stejně jako on se může občas nalézt i v krku klinicky zdravých jedinců. (4, 18, 26)

Citlivost na antibiotika. Citlivost je dobrá k penicilinům a makrolidům, proti tetracyklinům se častěji zjišťuje rezistence. Výsledky studie kmenů *Streptococcus agalactiae*, u nichž byla vyšetřena citlivost současně referenční agarovou metodou a diskovou difúzní metodou, potvrdily dosavadní dobrou citlivost tohoto druhu k penicilinu. A i když je *S. agalactiae* citlivý na penicilin, u infekcí jím vyvolaných je častěji lékem volby ampicilin. Při alergii (na penicilinovou řadu) s nízkým rizikem vzniku anafylaxe lze podat cefazolin. Při alergii s vysokým rizikem vzniku anafylaxe podáváme klindamycin (pro výhodnější farmakokinetické parametry) nebo erytromycin. Rezistence k erytromycinu byla zjištěna u 4,4 % izolátů od gravidních žen a v téměř dvojnásobně vyšší frekvenci u neinvazivních (7,0 %) a invazivních kmenů (8,5 %) izolovaných od novorozenců. Kmeny rezistentní k erytromycinu byly s výjimkou

jednoho kmene současně rezistentní také ke klindamycinu. Převaha izolátů *S. agalactiae* rezistentních k erytromycinu (65,5 %) příslušela k sérotypu V. (18, 28, 30)

Prevence. Screeningu streptokokové infekce by se měly podrobit všechny těhotné ženy (s výjimkou žen s GBS-pozitivní kultivací moči kdykoliv v průběhu těhotenství) mezi 35. až 38. týdnem těhotenství. Velké části novorozeneckých infekcí lze zabránit podáním penicilinu nebo ampicilin rodičce během porodu. Problémem je, jak identifikovat případy, kdy je to nutné. Někteří tuto profylaxi aplikují každé rodičce, u níž lze počítat s vyšším rizikem infekce (protrahovaný porod apod.), jiní se snaží mít antibiotickou profylaxi podloženou výsledkem mikrobiologického screeningu těhotných pomocí selektivních pomnožovacích půd. K vyšetření rodiček je ale třeba užít rychlejších postupů. Bohužel se zdá, že profylaxe streptokokových novorozeneckých sepsí penicilinovými preparáty vede ke zvýšenému výskytu sepsí vyvolaných *Escherichia coli*, a proto řešením může být jen vývoj vakcíny proti *S. agalactiae*. (7, 9, 18, 33)

1.3. Ostatní beta-hemolytické streptokoky

Z dalších beta-hemolytických streptokoků se běžně izolují kmeny, které mají skupinový antigen C, F a G. Podle morfologie kolonií je možno tyto streptokoky rozdělit na ty, které tvoří „velké“ (>0.5 mm za obvyklých podmínek) kolonie podobné *S. pyogenes*, a ty, které rostou v malých koloniích. Kmeny tvořící „malé“ kolonie patří většinou do tzv. skupiny *S. milleri*, kam patří *S. anginosus*, *S. intermedius* a *S. constellatus* se skupinovými antigeny F, G, A a C. Hemolýza na krevním agaru může být různého typu. Izolují se zejména z faryngu, kde patří k normální flóře, ale také z gastrointestinálního traktu a genitálního traktu. Streptokoky ze skupiny C (*S. equisimilis*) a G (velké kolonie) mohou být příčinou faryngitid (někdy komplikovaných akutní glomerulonefritidou), epiglottitid, sinusitid, meningitid, infekcí měkkých tkání, perikarditid a endokarditid. Streptokoky druhů patřících do skupiny *S. milleri* jsou řazeny k viridujícím streptokokům. Streptokoky *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. dysgalactiae* (skupina C), *S. canis* (skupina G), *S. suis* (skupina R, S) a *S. porcinus*

(skup. E, P, U, V) jsou zoopatogenní a v patogenezi onemocnění u lidí se uplatňují jako podmíněné patogeny u imunokompromitovaných jedinců. Tato taxonomie ostatních beta-hemolytických streptokoků je komplikovaná a stále se mění. Jedním z důvodů je, že k identifikaci druhu zde přítomnost stěnového antigenu nestačí. Určitá sérologická skupina dle Lancefieldové může totiž obsahovat několik odlišných druhů a naopak v jednom druhu se mohou vyskytovat kmeny obsahující rozličné skupinové antigeny. (1, 7, 33)

V poslední době se díky zlepšené mikrobiologické diagnostice setkávají lékaři s nálezem beta-hemolytických streptokoků sérologické skupiny C. Nejčastěji nalézáným streptokokem této skupiny bývá *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*. Vyvolává rozsáhlou paletu onemocnění, jejichž manifestace je prakticky neodlišitelná od infekcí vyvolaných *S. pyogenes*, nemá však vztah ke vzniku revmatické horečky. V poslední době byla potvrzena účast *S. constellatus* ssp. *pharyngis* na vzniku akutní faryngitidy. Lékem volby pro beta-hemolytické streptokoky skupiny C je penicilin G. Všechny kmeny jsou k penicilinu citlivé, penicilin tolerantní izoláty byly popsány. Kombinovaná terapie, penicilin a gentamicin, je doporučena pro léčbu endokarditid, meningitid, septických artritid a bakteriemií u neutropenických pacientů. (20)

1.3.1. *Streptococcus dysgalactiae*

Z beta-hemolytických streptokoků obsahujících polysacharidové antigeny sérologické skupiny C a G je od člověka nejčastěji izolován *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* (dříve nazývaný pouze *S. equisimilis* pro kmeny skupiny C a *Streptococcus species G* pro izoláty skupiny G). I když většina kmenů se řadí do skupiny C, mnohé patří do skupiny G, vzácně i A a L. Mnohé faktory virulence *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* jsou podobné jako u *S. pyogenes* vč. homologů genu emm nebo streptolysinu O. U člověka je častěji izolován z případů tonsilitid a faryngitid než z krku zdravých osob. Vyvolává jak infekce mírné a povrchové, tak i onemocnění závažná – bakteriémie, septikémie, streptokokový syndrom toxického šoku, hnisavé infekce kůže a měkkých tkání, nekrotizující fasciitidu, infekce pleuropulmonární a metastaticky

rozšířené. Spektrum onemocnění zahrnuje i poststreptokokové následky – peritonsilární absces, akutní glomerulonefritidu a reaktivní artritidu. (20, 22, 33)

1.3.2. *Streptococcus equi*

Tento streptokok rovněž patří do skupiny C. Jeho povrchový protein je blízký M-proteinu *S. pyogenes* – brání fagocytóze a podněcuje tvorbu protekčních opsonizačních protilátek. Od předchozího se liší biochemicky. Vyvolává mimo jiné mastitidy skotu a k většině lidských nákaz dochází po konzumaci nepasterizovaného mléka a mléčných výrobků. Kromě faryngitid byl izolován z řady pyogenních nákaz podobně jako předchozí streptokok. Po infekci *S. equi* ssp. *zooepidemicus* se může dostavit glomerulonefritida. (7, 20, 33)

1.3.3. *Streptococcus canis*

S. canis je patogenem psů. Tento patogen obsahuje antigen G a byl popsán jako původce sepse a meningitidy u člověka. (33)

1.3.4. *Streptococcus porcinus*

S. porcinus bývá nalézán u prasat a náleží do některé ze skupin E, P, U nebo V dle Lancefieldové. Byl izolován z urogenitálního traktu žen, řídce i v souvislosti s infekcí kolem porodu. Králičí antiséra a příprava antigenních extraktů jsou pro náročnost součástí práce pouze specializovaných laboratoří. Typické kmeny vyvolávají údajně mnohem širší zónu beta-hemolýzy než *S. agalactiae*. (22, 33)

1.3.5. *Streptococcus iniae*

S. iniae byl izolován z ryb a delfínů. Beta-hemolýza může být někdy patrna pouze ve vpiších do agaru. U osob zpracovávajících kontaminované ryby vyvolal *S. iniae* septické onemocnění. (1, 33)

1.3.6. Skupina *Streptococcus anginosus*

Žádný ze streptokoků asi nezpůsobil více taxonomických zmatků než druhy řazené do této skupiny a označované dříve americkými mikrobiology jako *S. anginosus*, britskými jako *S. milleri*. Problém je v tom, že příslušníci této skupiny mohou obsahovat antigeny C, F, G, A, ale také žádný, a beta-hemolytické jsou jen některé kmeny. Jejich kolonie jsou ve srovnání s jinými beta-hemolytickými streptokoky obsahujícími antigen C (např. *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*) výrazně drobnější. Poslední klasifikace rozeznává v této skupině tři druhy, z nichž jeden má dva poddruhy: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* ssp. *constellatus*, *Streptococcus constellatus* ssp. *pharyngis* a *Streptococcus intermedius*. Pro lékařskou mikrobiologii je důležité, že beta-hemolytické kmeny všech druhů byly izolovány od člověka. Izoláty *S. anginosus* pocházejí většinou z urogenitálního a zažívacího traktu a jsou původci nejčastěji lokálních hnisavých infekcí, oba poddruhy *S. constellatus* jsou izolovány většinou z faryngitid a kmeny *S. intermedius* bývají původci mozkových a jaterních abscesů, artritid a peritonitid. (20, 22, 33)

1.3.7. *Streptococcus suis*

Streptococcus suis je v celém světě rozšířený zvířecí patogen vyvolávající meningitidy, endokarditidy, artritidy, septikémie a respirační infekce u vepřů, skotu, ovcí a koz. Může být izolován u koní, koček a psů. U osob ošetřujících uvedená zvířata, zejména pak zaměstnanců jatek pracujících se syrovým masem, byl ve světě popsán jako etiologické agens meningitid, endokarditid, infekcí kůže a průjmových

onemocnění. V ČR nebylo žádné z uvedených onemocnění u lidí dosud dokumentováno, nebo publikováno. Pouze v březnu roku 1996 byl u muže z Bratislavy z likvoru a hemokultury izolován *Streptococcus suis*. Výsledky byly zpracovány v NRL pro streptokoky a enterokoky. Incidence u zvířat není známa, běžně se však vyskytují a je nezbytné i v našich podmínkách s antropozoonózou způsobenou streptokoky druhu *S. suis* počítat.

S. suis jsou malé ovoidní koky (se snahou tvořit tyčky) menší než 2 μm v průměru, vyskytující se jednotlivě, ve dvojicích, vzácně v krátkých řetízcích, G+, nepohyblivé. Jsou fakultativně anaerobní, kataláza negativní. Kmeny náleží k sérologickým skupinám R (*S. suis* II), S (*S. suis* I), RS (*S. suis* I/2), nebo skupinový antigen nesyntetizující (další sérotypy). V současnosti je popsáno více než 35 sérotypů, u kmenů izolovaných z infekcí zvířat prevaluje serotyp 2, u lidí serotypy 2, 4 a 14. Kmeny *S. suis* mohou zkříženě reagovat s antisérem skupiny D. Na médiích s krví vyrůstají *S. suis* většinou v koloniích obklopených viridací, mohou být i beta-hemolytické (beta-hemolýza je zvýrazněna na médiích s koňskými erytrocyty). Kmeny jsou citlivé k beta-laktamovým antibiotikům, trimethoprim-sulfomethoxazolu a gentamicinu, rezistentní na tetracyklin erytromycin a klindamycin. (1, 21, 33)

2. Cíle práce a hypotézy

2.1. Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce je na základě dostupných informací zjistit různé způsoby určení a detekce beta-hemolytických streptokoků a zároveň si osvojit základní laboratorní techniky používané k diagnostice těchto streptokoků v klinické mikrobiologii. Současně bych chtěla poukázat na skutečnost, že důraz kladený na jejich přesnou identifikaci, by se neměl znevažovat.

2.2. Předpokládané hypotézy

- H1: K diagnostice jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků jsou v současné době klasické kultivační metody zcela postačující.
- H2: K diagnostice jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků je nutné použít jak klasické kultivační metody, tak i speciální laboratorní metody a dostupné testy.
- H3: K diagnostice jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků stačí použít speciální identifikační metody a testy.

3. Metodika

Pro tuto práci jsem zvolila popis jak základních, tak i speciálních laboratorních metod, které se využívají k diagnostice různých typů beta-hemolytických streptokoků v klinické mikrobiologii v současné době.

3.1. Charakteristika souboru

Sběr dat jsem prováděla v mikrobiologické laboratoři LABOMA a. s. se sídlem v Českých Budějovicích, do které se sváží materiál z ordinací praktických lékařů. Laboma mikrobiologická laboratoř a.s. zajišťuje svými službami kromě jihočeského regionu částečně také region západočeský a jihomoravský. Údaje o výskytu jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků byly sledovány za časové období leden 2007 – prosinec 2007. Všechny typy beta-hemolytických streptokoků se v mikrobiologické laboratoři LABOMA a. s. ve většině případů určují níže popsanými testy a metodami.

3.2. Určování a diagnostika beta-hemolytických streptokoků

3.2.1. *Streptococcus pyogenes*

Klasickou metodou je kultivace výtěru z krku, což představuje stěr z tonsil a zadní stěny hltanu. Kultivace ve zvýšené tenzi CO₂, prodloužení inkubace na 48 hodin, subkultura z bujony, přidání disku s kanamycinem nebo cotrimoxazolem nebo přímo selektivní krevní agar s těmito látkami, to vše může zvýšit záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny A, pokud se v krku vyskytují v malém počtu. Víme, že u zdravých nosičů (až 10 % populace) se tyto mikroby mohou vyskytovat v malém množství v krku a naopak při typických streptokokových angínách a při spále je kultivační nález *S. pyogenes* charakteristicky masivní. K jeho záchytu by měl stačit neselektivní krevní agar s beranými erytrocyty, doplněný v místě předpokládaného hustého nárůstu několika

šikmými vpichy kličkou ke dnu misky pro záchyt hemolýzy vyvolané oxygenlabilními hemolyziny. Inkubuje se při 37 °C, za 19 hodin se odečítá a odečet se opakuje za 48 hodin. K záchytu dalších možných původců angín je třeba doplnit roztěr stafylokokovou čarou. Katalasanegativní beta-hemolytické kolonie se zařadí do skupiny A pomocí latexové aglutinace. Bacitracinový test se již považuje za obsoletní, navíc bývá pozitivní u 6 až 8 % streptokoků skupin C a G. *S. pyogenes* má dále pozitivní tzv. PYR – test na pyrrolidonylaminopeptidasu. Tato přímá metoda (kultivační záchyt na krevním agaru s následnou identifikací druhu orientačními testy) dále využívá průkaz skupinového antigenu A, případně typizaci – podle proteinu M a opacitního faktoru, proteinu T a R. Průkaz antigenů skupiny A je rychlý a specifický přímo v odebraném výtěru, spolehlivý je však jen při vysokém počtu streptokoků v hrdle. Jeho výhodou je, že zůstává pozitivní i v případě nasazení antibiotické léčby. Tento test by však měl být (při nejmenším při negativním výsledku) provázen odebráním dalšího výtěru ke standardní kultivaci. Budoucnost ukáže, zda se vyplatí průkaz specifických nukleových kyselin *S. pyogenes* ve výtěrech z krku. Mikroskopický nález může mít cenu při vyšetřování hnisu, u výtěru z tonsil je vzhledem k řadě druhů fyziologicky přítomných streptokoků bezvýznamný. (29, 33)

Nepřímé diagnostické metody zahrnují průkaz protilátek proti streptokokovým antigenům především proti streptolysinu O (ASLO), proti deoxyribonuklease B (ADNB), proti hyaluronidáze. Tato nepřímá diagnostika je významná zejména při hodnocení rizika vzniku sterilních následků a jejich diagnostice. Při podezření na nedávno proběhlou streptokokovou infekci, příp. při podezření na hrozící pozdní následky se zasílá krev na průkaz ASLO a antideoxyribonukleasy B (ADNB). (1, 14, 22)

3.2.2. *Streptococcus agalactiae*

Infekce streptokoky skupiny B lze prokázat pouze přímo. Odebírá se vhodný materiál dle charakteru infekce – likvor, krev, moč, hnis apod. Zatím je nejspolehlivější klasická kultivace na krevním agaru doplněném stafylokokovou čarou, kde pozitivní

CAMP – fenomén zachytí i nehemolytický kmeny. Doporučuje se kmen produkující pouze beta-toxin. Vedle takového kmene se *S. agalactiae* prozradí. Podezřelé kolonie se identifikují latexovým testem (ale i koagulací, precipitací aj.) na přítomnost skupinově specifického antigenu B, levněji, ale pomaleji pomocí CAMP – testu. K rychlému průkazu antigenů *S. agalactiae* v likvoru se užívá latexová aglutinace. Ke screeningu těhotných se vyšetřují výtěry z rektu a vaginy po pomnožení v selektivním Toddově-Hewittově bujónu s kyselinou nalidixovou a gentamicinem. K vyšetření rodiček mohou být použity i selektivně diagnostické půdy se škrobem, v nichž již za 18 hodin vyrostou *S. agalactiae* v oranžových koloniích. Přítomnost *S. agalactiae* může být imunologickými metodami zjištěna bez kultivace ve vaginální sekretu rodičky nebo v tělních tekutinách (moč, sérum, mozkomíšni mok) při podezření na sepsi či meningitidu novorozence. (1, 22, 33)

3.2.3. Ostatní beta-hemolytické streptokoky

Streptococcus dysgalactiae ssp. *equisimilis* (patřící do skupiny C) roste v koloniích podobných *S. pyogenes*, s výraznou beta-hemolýzou, ale všechny doposud zmíněné testy k identifikaci jednotlivých beta-hemolytických streptokoků – CAMP, PYR a hippurát – má negativní. I po infekci tímto streptokokem stoupá hladina ASLO.

Streptococcus canis má pozitivní CAMP – test.

Streptococcus porcinus činí potíže v mikrobiologické diagnostice: má totiž pozitivní CAMP – test a uvedené skupiny nelze identifikovat latexovým testem.

Streptococcus iniae obsahuje skupinově specifický antigen skupiny Z, má pozitivní PYR – test a CAMP – test. (1, 22)

3.3. Základní laboratorní metody

Základem celé této problematiky vůbec, je správný odběr, transport, zpracování materiálu a jeho laboratorní a klinicko-mikrobiologické hodnocení. Nicméně hlavní roli v diagnostice beta-hemolytických streptokoků především hraje klasická kultivace na

běžných (krevní agar) i speciálních obohacených půdách. Pro základní rozlišení různých mikroorganismů, a tudíž i beta-hemolytických streptokoků, je nutná znalost morfologie těchto patogenů.

3.3.1. Odběr materiálu

Při angíně, spále, revmatické horečce, akutní glomerulonefritidě a vyšetření bacilonosičství se materiál získává krčním a nosním výtěrem pomocí sterilního výtěrového tamponu nejlépe z dakronu. Kultivace výtěru z krku je spolehlivý způsob používaný k vyšetření původce bakteriální tonsilofaryngitis. Tato metoda má vysokou hodnotu pro průkaz *Streptococcus pyogenes* a slouží také jako standard pro hodnocení kvality rychlých diagnostických testů pro průkaz antigenu tohoto druhu. (16)

Při krčním výtěru se šroubovitým pohybem tamponem setře povrch tonsil a zadní klenba faryngu. Je třeba vyhybat se přitom patrovým obloukům a bukální sliznici za účelem minimalizace kontaminace vzorku běžnou mikroflórou. Cílem je získat na tampon co nejvíce materiálu. Krční výtěr provádíme vždy za kontroly zraku a především rychle. Pak se ani důkladným náběrem materiálu nevyvolá dávivý reflex. Při nosním výtěru se tamponem otírá po celém obvodu jen sliznice obou nosních vchodů. V situacích, kdy se neočekává bohatá kultura streptokoků na sliznicích (např. u revmatické horečky nebo akutní nefritidy) se zvýší pravděpodobnost záchytu streptokoků provedením dvou nebo i více krčních a nosních výtěrů, třeba bezprostředně po sobě. Nakonec se vatový tampon vloží do transportního média. (35)

U secernujících infekcí (např. otitis media, sinusitis) lze špičkou tamponu nabrat hnis. U impetiga je třeba získat něco exsudátu ze spodiny léze. U erysipelu a ostatních infekčních procesů probíhajících různě hluboko pod povrchem kůže nebo sliznice (např. abscesy, meningitis) se materiál získává punkcí nebo při terapeutické incizi. Při screeningu streptokokové infekce u těhotných se odběr kultivačních vzorků provádí z postranních stěn dolní třetiny pochvy. Odběr materiálu z rekta není přínosem, a tak kombinovaný odběr není indikován. Odběry materiálu z jiných tělních partií, jako třeba z urogenitálního traktu (vulvovaginitis, puerperální sepse, nosičství streptokoků skupiny

B) se provádějí stěrem sterilními vatovými tampony. Při podezření na bakteriemi nebo sepsi se odebírá za přísně sterilních podmínek krev na hemokulturu. Při odběru krve (např. na ASLO) je třeba se vzorkem postupovat tak, aby nedošlo k jeho kontaminaci. Vzhledem k tomu, že streptokoky mohou vyvolat velmi rozmanitá onemocnění a uplatňují se jako nosičské kmeny a součást normální mikroflóry, lze je zachycovat z velmi rozmanitých typů materiálu, např. z výtěrů z dýchacích cest, z moče, krve, kožních lézí, z hnisu, výtěrů vaginy, ran, ze stolice, likvoru atd. (18)

3.3.2. Zpracování materiálu a laboratorní hodnocení

Pokud se nemůže materiál dopravit do laboratoře ještě v den odběru, je nutné ho k zachování záhytu streptokoků uchovávat v odběrové soupravě s transportním médiem (Amies, Stuart). Výtěr bez transportní půdy se musí zpracovat v den odběru. Jinak se výtěrové tampony otáčivým pohybem očkují přímo asi na třetinu krevního agaru. Po rozočkování se přes základní inokulum naočkuje ještě stafylokoková čára k průkazu satelitního fenoménu. Inkubuje se při 37°C do druhého dne a odečítá se semikvantitativně. (16)

Vyrostlé kolonie hemolytických streptokoků se rozpoznávají podle typické beta-hemolýzy a tvaru kolonií. Pozornost je přitom nutno věnovat kmenům některých skupin (např. B a D), jež vytvářejí hemolýzu s lehkým náznakem přechodu do alfa-hemolýzy. K izolaci (často hned do čisté kultury) stačí dotek takovéto hemolýzy bakteriologickou kličkou a následné rozočkování. Růst beta-hemolytických streptokoků v základním inokulum do 50 kolonií se hodnotí jedním křížkem (+). Objevuje-li se růst ze základního inokula i v očkovacích čárách, hodnotí se dvěma křížky (++) . Pokračuje-li růst streptokoků i do koncových čar nebo je v čisté kultuře, hodnotí se třemi křížky (+++). Je nutno bezpečně rozlišit hemolytické streptokoky od ostatních bakterií, které mohou na krevním agaru vytvářet podobnou beta-hemolýzu jako hemolytické streptokoky. K rozlišení je možno použít mikroskopického vyšetření preparátu obarveného podle Grama. Při vyšetření krve na ASLO pracujeme s krevním sérem.

3.3.3. *Kultivace na půdách*

K vyšetření materiálů, kde se očekává výskyt beta-hemolytických streptokoků, je třeba použít složení půd, jejichž základy jsou označené např. EH (enhanced hemolysis). Jsou připraveny z vybraných surovin tak, aby hemolytické reakce na nich byly výraznější. Na žádném komerčním bujonu se nedocílilo tak vysokých titerů streptolysinu O jako na bujonu s infusí z čerstvého hovězího masa. Uvedu zde příklady typů vysoce výživných bujonů, které mohou sloužit ke kultivaci beta-hemolytických streptokoků. (35)

Todd-Hewitt Broth. Složení tohoto klasického bujonu s infusí se uvádí v g/litr a jednotlivé složky jsou: infuse ze 450 g libového mletého masa (10,0), trypton (20,0), glukosa (2,0), NaCl (2,0), NaHCO₃ (2,0) a Na₂HPO₄ (0,4). pH směsi by mělo být $7,8 \pm 0,2$. V 1 litru destilované vody se rozpustí 36,4 g, rozplní do vhodných nádob a autoklávuje se 10 min při 121 °C. Tento bujon se používá ke kultivaci streptokoků skupiny A před sérotypizací, k všeobecnému použití a k hemokultivaci. Půdy většiny výrobců se liší prakticky jen typem peptonu.

Tryptose Phosphate Broth. Tento bujon bez infuse se skládá z: tryptosu (20,0), glukosy (2,0), NaCl (5,0) a Na₂HPO₄ (2,5). pH směsi by mělo být $7,3 \pm 0,2$. V 1 litru destilované vody se suspenduje 29,5 g, dle potřeby se přidá 0,1% agaru. Rozvaří se, rozplní a sterilizuje v autoklávu 15 min. při 121°C. Tento pufrovaný bujon se používá především ke kultivaci náročných bakterií, hlavně streptokoků a pneumokoků. (34)

Z médií obohacených krví stojí na prvním místě krevní agar, půda, kterou někteří autoři řadí pro její nenahraditelnost v klinické mikrobiologii mezi půdy základní. Jiní pak pro možnost diagnostikovat na ní hemolytické schopnosti mikrobů jí považují za půdu diagnostickou. Nicméně je třeba mít na zřeteli, že běžně připravovaný krevní agar je obohacen celou krví, tedy nikoli jen erytrocyty, ale i několika procenty krevního séra. Pro jeho poměrně vysokou výživnou hodnotu na něm vyrostou naprostá většina lékařsky důležitých mikrobů. Jeho neocenitelnou výhodou je, že umožňuje sledovat hemolytické vlastnosti vypěstovaných kmenů a podle nich je někdy přímo určit čili diagnostikovat. Např. streptokoky skupiny D vyvolávají výraznou beta-hemolýzu na

krvním agaru z koňské krve. Uvedu zde 2 příklady sušených základů určených pro přípravu krevního agaru. (35)

Bacto Blood Agar Base. Jeho složení je: hovězí srdce (500,0), tryptosy (10,0), NaCl (5,0) a agar (15,0). Optimální pH by mělo být $6,8 \pm 0,2$. V 1 litru destilované nebo deionizované vody se rozmíchá 40 g půdy a povaří do úplného rozpuštění. Sterilizuje se v autoklávu 15 min. při 121 °C. Po zchlazení na 45–50 °C se k základu asepticky přidá 5% sterilní, defibrinované krve ohřáté na pokojovou teplotu a dobře se rozmíchá. Používá se k izolaci a pěstování náročných mikrobů. Lehce kyselý základ podporuje vznik zřetelných hemolytických zón, a proto se krevní agar z něj připravený dobře hodí k pěstování streptokoků, jež vyrůstají v morfoloicky typických koloniích.

Bacto TSA Blood Agar Base. Skládá se z: pankreatického kaseinového hydrolyzátu (15,0), papainového sójového hydrolyzátu (5,0), NaCl (5,0) a agaru (15,0). Optimální pH je $7,3 \pm 0,2$. Takovéto složení (40 g základu) se rozmíchá v 1 litru destilované nebo deionizované vody, za mírného míchání se rozvaří, přesterilizuje v autoklávu 15 min. při 121 °C, ochladí na 45–50 °C, asepticky doplní 5% sterilní defibrinované krve, pečlivě promísí a rozplní do misek. Tento základ speciálně vyvinutý pro přípravu krevního agaru, který dává správné a výrazné hemolytické reakce beta-hemolytických streptokoků. Z tohoto důvodu je základ téměř prostý redukujících cukrů, jež mohou nepříznivě ovlivnit streptokokovou beta-hemolýzu. (34)

Koňské sérum slouží jako obohacovadlo v sérové půdě Islamově agaru (též GBS-agar) určeného k pěstování streptokoků skupiny B (*Streptococcus agalactiae*) a dalších bakterií. V anaerobní atmosféře tvoří na této půdě *S. agalactiae* oranžově červené kolonie. Příbuznou půdou je kalné bělavé médium Granada postavené místo agaru na škrobu. Je určeno k rychlé diagnostice *S. agalactiae* u těhotných. Charakteristické oranžově červené kolonie se na něm někdy objeví již za 10 až 18 hodin. (35)

GBS Agar Base (Islam). Jeho složení je: proteosový pepton (23,0), rozpustný škrob (5,0), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,5), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (5,75) a agar (10,0). Optimální pH je $7,5 \pm 0,1$. V 1 litru destilované vody se rozmíchá 42,5 g základu a rozvaří. Sterilizuje se autoklávováním 15 min. při 121 °C. Po ochlazení na 50 °C se asepticky přidá 50 ml sterilního inaktivovaného hovězího séra, rozmíchá a vylévá do misek. Tyto půdy se

používají k izolaci streptokoků skupiny B (GBS, *Streptococcus agalactiae*) z klinického materiálu. Za anaerobních podmínek, zejména pak v okolí sulfonamidového (příp. kotrimoxazolového) disku, roste většina kmenů *S. agalactiae* v oranžově červených koloniích. Existuje i tekutá varianta této půdy (GBS médium), v níž *S. agalactiae* roste v podobě oranžově zbarveného sedimentu a která se dá využít jako screeningové půda ke zjištění vaginální kolonizace streptokoky skupiny B. (34)

Hydrolyza hippurát se užívá k odlišení streptokoků skupiny B od ostatních beta-hemolytických streptokoků. Půda obsahuje pouze 1% hippurát sodný. Streptokoky skupiny B jej rychle štěpí na benzoát sodný a glycin. Po přidání ninhydrinu dojde k oxidativní deaminaci α -aminoskupiny v glycinu na odpovídající aldehyd za současného vzniku CO₂, čpavku a hydridantinu. S poslední látkou a se zbylým ninhydrinem reaguje amoniak a vytvoří modrofialově až purpurově zbarvený komplex. Uvádím 1 příklad komerčního přípravku.

HIPPURÁT test. Skládá se z: testačních proužků nasycených hippurátem sodným a ninhydrinového činidla. Z 24 – hodinové kultury se připraví v 0,6 ml fyziologického roztoku ve zkumavce suspenze o zákalu 2 McFarlandovy stupnice, vloží se do ní proužek, inkubuje 22 až 24 hod. při 37 °C, zakape 4 kapkami činidla a nechá 5 až 10 min. stát. Tento test se používá k průkazu hydrolyzy hippurátu. Pozitivní výsledek se projeví vznikem modrého až modrofialového prstence. (22)

K potlačení růstu gramnegativních mikroorganismů se používají půdy s azidem sodným, fenylethanolem, krystalovou violetí, thaliem, lithiem, glycinem nebo telluričitanem draselným. Jen málo druhů půd obsahujících uvedené inhibitory je čistě selektivních. Přidáme-li do základu pro krevní agar azid sodný v koncentraci kolem 0,02%, získáme selektivní půdu k izolaci streptokoků a stafylokoků (půda zvaná azidový základ pro krevní agar). K selektivnímu záchytu stafylokoků a streptokoků se k základům pro běžný nebo krevní agar přidává rovněž fenylethanol (agar s fenylethanolem). Přídavek krystalové violeti zvyšuje selektivitu těchto půd pro streptokoky (streptokokový selektivní agar). Elektivní agar pro beta-streptokoky sec. Liebermeister et Braveny je nutričně velice chudé médium, jež svým obsahem živin potlačuje jednak růst všech mikrobů vyskytujících se ve výtěrech z nosohltanu, jednak

viridaci alfa-streptokoků. Tato půda je ale obohacena kvasničným extraktem a lysinem, což obojí zesiluje streptokokovou beta-hemolýzu. Trpasličí kolonie beta-hemolytických streptokoků jsou tedy obklopeny nápadně širokou zónou úplné, ostře ohraničené beta-hemolýzy a tento typický obraz je umožňuje snadno rozeznat. (34)

Laboratorní diagnostika beta-hemolytických streptokoků bývá komplikována tím, že se na infekci často podílejí i další, růstově méně náročné bakterie (*Staphylococcus aureus*, pseudomonády a enterobakterie). Ty na krevním agaru přerůstají kolonie beta-hemolytických streptokoků. Proběhla studie, při které byl srovnán záchyt beta-hemolytických streptokoků na krevním agaru a na selektivním krevním agaru s přídavkem amikacinu (36 µg/ml). Zjistilo se, že bez použití selektivní půdy by uniklo více izolátů beta-hemolytických streptokoků u vzorků z kožních lézí. Použití selektivního krevního agaru s amikacinem může zabránit přehlédnutí kolonií beta-hemolytických streptokoků. Tyto výsledky ukazují na důležitost využívání selektivních půd pro streptokoky. (8)

Agar Columbia je živná půda speciálně uzpůsobená ke kultivaci bakterií vyžadujících peptony, které jsou součástí agaru. Na této půdě se snadno kultivují streptokoky a pneumokoky. Agar Columbia představuje také výborný základ pro přípravu agarů s čerstvou i s vařenou krví. Cílený výběr peptonů umožnil výrazné zlepšení kvality hemolýz. Pro přípravu agaru s čerstvou krví se přidá 5 % sterilní defibrinované koňské nebo beraní krve. Agar s čerstvou krví je vhodný pro kultivaci streptokoků. Velmi často se k selektivnímu záchytu streptokoků z klinického materiálu používá krevní agar Columbia CNA. Jeho bohatý živný základ ze speciálních peptonů z kaseinu a živočišných tkání a z trypticky natráveného hovězího srdce je doplněn škrobem a obohacen beraní krví. Tento krevní agar se používá při předpokladu výskytu gramnegativních tyčků a protea.

Krevní agar Columbia. Složení: Speciální směs peptonů (23,0), škrob (1,0), NaCl (5,0), agar (13,0). Optimální pH je $7,3 \pm 0,2$. V 1 litru destilované vody se rozmíchá 42 g práškového agaru. Pomalu se přivede k varu za stálého promíchávání až do úplného rozpuštění. Autoklávuje se 15 min. při 121°C. (35, 38)

Bacto Columbia CNA agar. Složení: speciální směs peptonů (20,0), srdcový tryptický hydrolyzát (3,0), kukuřičný škrob (1,0), NaCl (5,0), kolistinsulfát (0,01), kyselina nalidixová (0,015) a agar (15,0). Optimální pH je $7,3 \pm 0,2$. V 1 litru destilované nebo deionizované vody se rozmíchá 44 g základu. Rozvaří a sterilizuje se v autoklávu 15 min. při 121 °C. Je třeba se vyvarovat přehřátí. Po ochlazení na 45–50 °C se asepticky přidá 5% sterilní defibrinované krve ohřáté na laboratorní teplotu a rozplní se do misek nebo zkumavek. Přídavek kolistinu a nalidixové kyseliny umožňuje inhibici gramnegativních bakterií. Selektivní základ pro krevní agar se používá k selektivní izolaci grampozitivních koků, a to i anaerobních.

K záchytu streptokoků důležitých v humánní i veterinární mikrobiologii slouží selektivní médium COBA. Jedná se o krevní agar z koňské krve připravený rovněž z bohatého základu Columbia, ale i s přídavkem streptokokového selektivního suplementu obsahujícího kolistin (10 µg/ml) a kyselinu oxolinovou (5 µg/ml). Tento suplement potlačuje všechny gramnegativní mikroorganismy a téměř všechny ostatní mikroby grampozitivní s výjimkou streptokoků (vč. anaerobních). Médium se doporučuje jako nejvhodnější k selektivnímu záchytu streptokoků např. z respiračního traktu. Hemolytické reakce jsou na něm jasné a zřetelné a streptokoky vč. *S. pyogenes* na něm vyrůstají stejně dobře jako na krevním agaru neselektivním.

Streptococcus Selective Medium (COBA Medium). Složení základu Columbia Blood Agar Base: speciální pepton (23,0), škrob (1,0), NaCl (5,0) a agar (10,0). Optimální pH $7,3 \pm 0,2$. Složení Streptococcus Selective Supplement (COA) – g/2 ml rehydratovaného přípravku: kolistinsulfát (0,005) a kyselina oxolinová (0,0025). V 1 litru destilované vody se suspenduje 39 g základu, rozvaří a sterilizuje v autoklávu 15 min. při 121 °C. Po ochlazení na 50 °C se přidá 5% sterilní defibrinované krve a 4 ml streptokokového selektivního suplementu na 1 litr základu, promíchá a rozplní do misek. Používá se k selektivní izolaci streptokoků z klinických vzorků nebo z potravin. Doporučuje se kultivovat anaerobně nebo v 5% CO₂. Kombinace obou inhibitorů vede k úplnému potlačení gramnegativních mikrobů a téměř všech nestreptokokových grampozitivních kmenů. Hemolytické reakce jsou zcela zřetelné a záchyt streptokoků skupin A, B, C, D a G je srovnatelný jako na neselektivním médiu. (34, 35)

3.4. Speciální laboratorní metody

Pro tuto práci je důležité shrnutí speciálních metod, které se používají k diagnostice beta-hemolytických streptokoků v klinické mikrobiologii. Každá mikrobiologická laboratoř si sama, dle svých podmínek, volí laboratorní postupy vedoucí k identifikaci jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků. Výrobu diagnostických přípravků a souprav pro mikrobiologické laboratoře u nás i v zahraničí zajišťuje řada společností. Z českých firem to jsou např. ITEST plus, s.r.o. a TEST-LINE s.r.o. Ze zahraničních především Murex, bioMérieux a DiaMondiaL.

3.4.1. PYR - test

V mikrobiologické laboratoři LABOMA a. s. se užívá PYRstrip 50 jako enzymatický test, ve kterém je prokazována přítomnost pyrolidonylpeptidázy (PYRázy), enzymu produkovaného všemi běžnými druhy enterokoků a 98 % kmenů *S. pyogenes*. Průkaz PYRázy je citlivá, rychlá a spolehlivá metoda s širokým využitím. Je podstatně vhodnější než test s použitím bacitracinového disku pro odlišení kmenů *S. pyogenes* a testy aplikované pro určení enterokoků. Test lze využít i při diferenciaci rodů G+, kataláza negativních bakterií. (tj. rod *Enterococcus*, *Aerococcus* a většina kmenů *Gemella*) a druhy (*Lactococcus lactis*), které jsou také PYR-pozitivní. Nicméně je nepravděpodobné, že by byly zaměněny se skupinou streptokoků kvůli jejich různé morfologii. Díky širokému rozsahu PYR-pozitivních druhů, které nepatří do rodu *Streptococcus*, by tedy měly být pomocí PYR-testu testované pouze čisté kultury streptokoků.

Substrátem PYRázy je β -naftylamid kyseliny pyroglutamové, jeho hydrolýza se ozřejmí reakcí s p-dimethylaminocinamaldehydem za vzniku červeného zbarvení. Celková doba provedení testu je 6 – 10 minut.

Součástí testu je 50 kusů testovacích proužků, 1 ml činidla a 1 pipeta. Test obsahuje plastové proužky s instalovanou papírovou zónou, která je nasycena chromogenním substrátem pro průkaz enzymu pyrolidonyl-peptidázy a lahvičku s

vyvíjecím činidlem. Při skladování v chladničce mohou v činidle vzniknout krystaly, které je nutno před použitím rozpustit zahřátím v termostatu. Proužky před použitím musí mít bílou funkční zónu a činidlo, musí mít žlutou barvu a nemělo by obsahovat krystaly.

Při pracovním postupu se papírovou zónou diagnostického proužku setře z krevního agarů s 24-hodinovou kulturou zkoumaného kmene několik suspektních kolonií a nechá se 5 minut inkubovat. Po 5 minutách se nanese na papírovou zónu plastovou kličkou nebo špičkou mikropipety cca 5 μ l vyvíjecího činidla, které musí být chráněno před světlem. Po 1–5 minutách reakce se odečte výsledek. Při negativní reakci v místě nanesené kolonie nedojde k barevné změně, naopak při reakci pozitivní dojde ke vzniku červené skvrny. (6, 22, 37)

3.4.2. Bacitracinový test

Diagnostické disky bacitracinu slouží ke snadnému odlišení beta-hemolytických streptokoků skupiny A (*Streptococcus pyogenes*) od ostatních skupin beta-hemolytických streptokoků. Test využívá vysoké citlivosti beta-hemolytických streptokoků skupiny A k nízké koncentraci bacitracinu (0,04 j.), která se projevuje vytvořením inhibiční zóny kolem disku bacitracinu. Ostatní beta-hemolytické streptokoky jsou k této koncentraci bacitracinu rezistentní.

Mohou se používat dva postupy: ve 2 ml fyziologického roztoku se resuspendují 2–3 kolonie testovaného kmene beta-hemolytického streptokoka. Suspenzí se přelije krevní agar a zbytek inokula odsaje. Po zaschnutí suspenze se přiloží sterilně bacitracinový disk. Inkubuje se 17–24 hod. při 37°C. Při druhém postupu se testovaný kmen naočkuje na krevní agar a na naočkovanou část půdy se sterilně přiloží bacitracinový disk. Inkubuje se 17 – 24 hodin při 37 °C.

Po inkubaci do druhého dne lze u kmenů skupiny A zjistit zábranu hemolýzy i růstu, kmeny ostatních skupin zpravidla inhibovány nejsou. Poté změříme přesně průměr inhibiční zóny kolem disku bacitracinu. Jestliže je průměr zóny větší než 10 mm, jedná se o beta-hemolytického streptokoka skupiny A (*Streptococcus pyogenes*). Je-li průměr zóny menší než 10 mm, jedná se o beta-hemolytického streptokoka jiné

sérologické skupiny. Spolehlivost tohoto testu se udává asi v 95 %.

Rozhodujícím faktorem pro vhodnost tohoto testu a uplatnění v praxi je skupinová příslušnost kmenů, které jsou testovány. Při určování kmenů izolovaných od nemocných lidí, u kterých převládají kmeny skupiny A, je bacitracinový test vhodný. Jde-li však o kmeny izolované od lidí bez klinicky zjevného onemocnění (např. u nosičů) nelze test doporučit. Řada kmenů skupiny C a G totiž vykazuje citlivost na bacitracin, která se velmi blíží citlivosti kmenů skupiny A. (6, 22)

3.4.3. *Latexová aglutinace*

Tato metoda, která je základem různých souprav diagnostických přípravků pro mikrobiologické laboratoře, jež jsou vyráběny mnohými společnostmi, slouží k rychlému, jednoduchému a přesnému určení sérologických skupin A, B, C, F a G beta-hemolytických streptokoků s negativním testem na pyráz. Jedná se tedy o rychlou latexovou aglutinaci mikrobů ze skupiny beta-hemolytických streptokoků. Výchozím materiálem pro určování jsou kolonie z krevního agaru. Skupinové určení beta-hemolytických streptokoků je rozhodující pro etiologickou diagnózu onemocnění a jeho racionální léčbu.

Principem testu je reakce antigenů specifických pro danou skupinu streptokoků se specifickými protilátkami navázaných na latexové partikule. Průkazem reakce specifických antigenů se specifickými protilátkami dané skupiny streptokoků je jasně viditelná aglutinace příslušné latexové suspenze. Antigeny je třeba napřed z bakterie extrahovat pomocí enzymů, které jsou součástí diagnostických souprav. Pracovní postup se vždy řídí dle návodu výrobce.

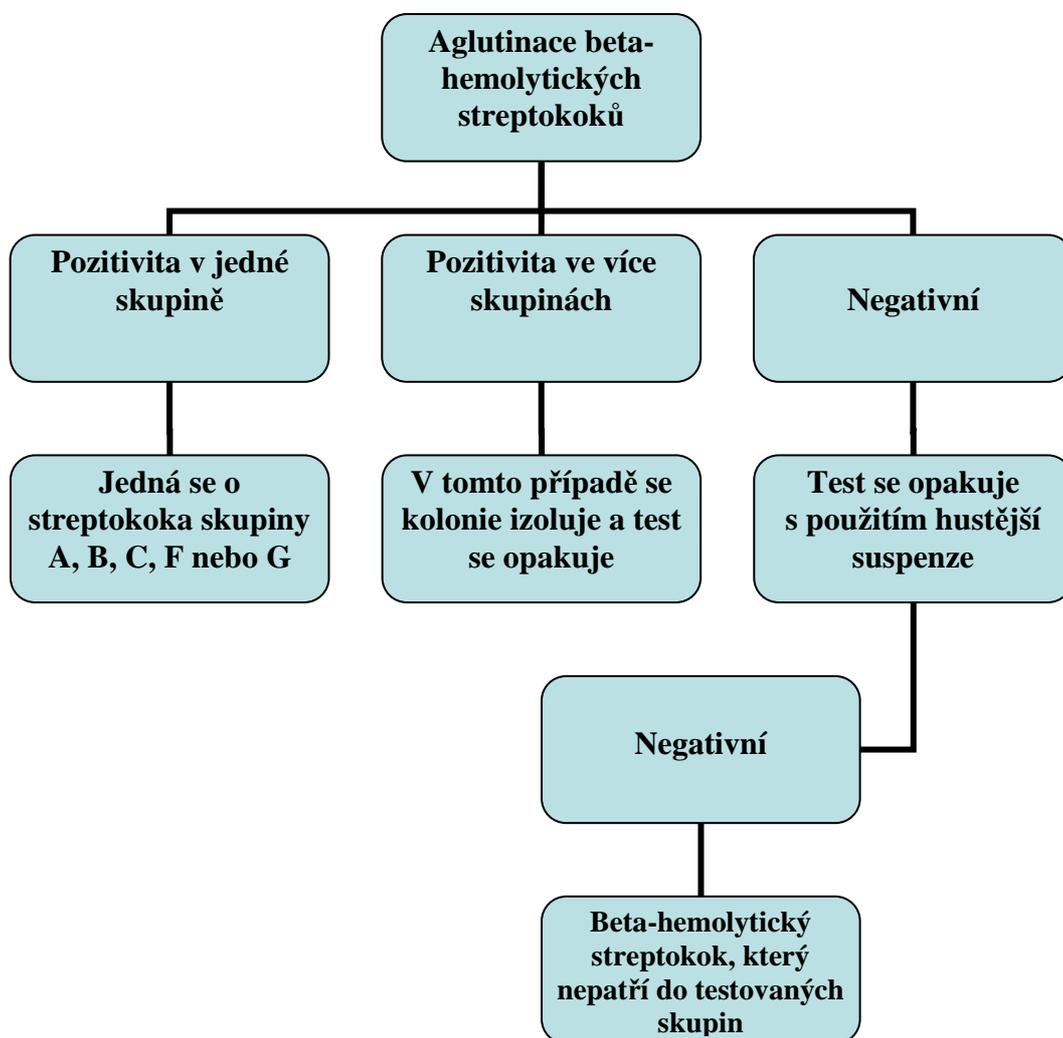
Před použitím se musí nechat všechny reagenty vytemperovat na laboratorní teplotu. Zkumavka se nejprve označí číslem, poté se do zkumavky kápne 1 kapka Činidla I (žlutý uzávěr) a resuspenduje se v ní asi 1–4 kolonie testovaného beta-hemolytického streptokoka narostlého na krevním agaru. Přidá se 1 kapka Činidla II (červený uzávěr) a 5–10 vteřin se roztok protřepává. Dále se přidá 5 kapek Činidla III (modrý uzávěr) a také se roztok protřepá. Poté se do každého kroužku aglutinační kartičky kápne 1 kapka modré latexové suspenze a vedle se přidá přiloženou

Pasteurovou pipetou 1 kapka suspenze testovaného kmene. Kapky se promíchají pomocí tyčinky a s aglutinační kartičkou se pak pomalým krouživým pohybem kývá. Aglutinace se odečítá do 1 minuty. Při kolébání s kartičkou se materiál ze sousedních ploch nesmí smíchat. Pokud se tak stane, test se opakuje.

V pozitivním případě (reakce specifických antigenů se specifickými protilátkami určité skupiny streptokoků) dojde do jedné minuty ke zřetelné aglutinaci, přičemž aglutinací rozumíme tvorbu viditelných zrníček, mezi nimiž je tekutina projasněna. Odečítání se provádí pouze očima bez použití lupy. Slabá aglutinační reakce by měla být opakována s použitím hustějšího inokula.

U negativního výsledku nedochází k žádnému viditelnému shlukování latexových částic (testovaný kmen nepatří k beta-hemolytickým streptokokům skupin A, B, C, G nebo F). (5, 11, 35)

AGLUTINAČNÍ SCHEMA:



3.4.4. CAMP – test

Principem CAMP-testu je zesílení hemolytického efektu beta-hemolyzinu stafylokoků a hemolyzinu streptokoků skupiny B (*Streptococcus agalactiae*) na beraní erythrocyty. Nekompletní beta-hemolýza vhodného kmene stafylokoka se za spolupůsobení hemolyzinu streptokoků skupiny B změní na výraznou kompletní hemolýzu, jež má charakteristický tvar motýlích křídel.

Test se provádí na krevním agaru. Na agarovou plotnu se naočkuje kličkou příčná čára testovaného kmene streptokoka a kolmo na ni čára kmene stafylokoka, produkujícího beta-hemolyzin. Po 16–20 hodinách inkubace při 37 °C se provádí odečítání. Při pozitivním testu se při průsečíku očkovacích čar obou kultur vytvoří kompletní hemolýza typické intenzity a tvaru. Používáme vhodný kmen stafylokoka a kontrolní kmen streptokoka skupiny B.

Screeningový CAMP-test je vysoce specifický při diferenciaci kmenů izolovaných z lidského materiálu. Naproti tomu není vhodný pro rozlišování kmenů zvířecího původu. Ve veterinárních mikrobiologických laboratořích je jeho diagnostická hodnota značně limitována CAMP pozitivními kmeny, které patří do jiných skupin streptokoků než do skupiny B. Pozitivní CAMP – test mohou mít i jiné bakterie, například *Corynebacterium glucuronolyticum*, jež vytváří žlutavé kolonie. Tyto grampozitivní tyčky se vyskytují vzácně především u mužů v urogenitálním traktu. (22)

3.4.5. Stanovení ASO (ASLO)

Soupravy na stanovení ASO jsou určeny k titraci anti-streptolysinu O (ASO) v sérech. ASO je protilátka proti streptolysinu O (SLO) – extracelulárnímu produktu streptokoků skupiny A, C a G. Prožití streptokokové infekce se tedy projeví vzestupem hladiny ASO. Tyto infekce jsou závažné zejména svými následky – akutní revmatickou horečkou a akutní glomerulonefritidou. Stanovení titru ASO je proto nezbytným doplňkem diagnostiky těchto onemocnění. Titraci ASO lze poměrně dobře standardizovat a protilátky lze určovat kvantitativně. Vzhledem k obrovské četnosti streptokokových infekcí lze též používat titrace ASO jako "screeningové" metody pro zjišťování nedostatečné reaktivity imunitního systému. Metody testující hladinu ASO umožňují rychlé a jednoduché provedení testu, protože firmami dodávaný SLO obsahuje předem stanovený počet mezinárodních jednotek (m.j.).

Principem testu je neutralizace SLO protilátkou (ASO) přítomnou v séru. Zbylý SLO se prokáže hemolýzou přidaných erytrocytů. Aby hemolýza proběhla, musí být SLO v redukovaném stavu.

K provedení této metody je zapotřebí: streptolysin O (purifikovaný filtrát kultury streptokoka skupina A produkujícího SLO v lyofilizované formě), redukční činidlo (dithionitan sodný), koncentrovaný pufovaný fyziologický roztok s albuminem (PFR+A), antistreptolysinu O standard-sérum o známém titru (purifikovaný lidský IgG) a králičí erythrocyty.

Provedení testu je následující:

1. Příprava pufovaného fyziologického roztoku s albuminem (PFR+A):

Obsah lahvičky s koncentrovaným PFR+A (4 ml) se naředí 56 ml destilované vody. Získá se 60 ml roztoku o pH asi 6,5 (pH roztoku se překontroluje a v případě potřeby upraví). Takto připravený roztok se uchovává při +4°C a mělo by se spotřebovat do 7 dnů.

2. Příprava suspenze králičích erythrocytů:

Králičí erythrocyty se promyjí 3x v PFR+A a centrifugují 10 min. Po poslední centrifugaci se připraví ze sedimentovaných erythrocytů 1% suspenze v PFR+A.

3. Příprava redukovaného streptolysinu O (SLO):

Do lahviček se SLO a redukčním činidlem se dá po 1 ml PFR+A (nejlépe injekční stříkačkou přes gumovou zátku, aby se zamezilo ztrátám lyofilizovaného materiálu). Po dokonalém rozpuštění se kvantitativně přenesou obsahy obou lahviček do 3,5 ml PFR+A. Takto připravený roztok SLO obsahuje 1 m.j./0,5ml. Roztok se musí spotřebovat tentýž den.

4. Ředění séra:

Ve zkumavkách se připraví dvě základní ředění vyšetřovaného, inaktivovaného (56°C po dobu 30 min.) séra: 1:25 (50 μ l séra + 1,2 ml PFR+A) a 1:30 (0,5 ml séra ředěného 1:25 + 0,1 ml PFR+A)

5. Příprava mikrotitrační destičky (typ U) a vlastní provedení testu:

Sérum se titruje ve vodorovné řadě mikrotitrační destičky. U každého vyšetřovaného séra se dá do prvních dvou jamek po 50 μ l PFR+A. Do zbylých 10 jamek se dá po 25 μ l PFR+A. Do první jamky se přenesou 50 μ l séra ředěného 1:25 a po důkladném promíchání se pomocí mikropipety přenesou 50 μ l do třetí jamky. Stejným způsobem se pokračuje v ředění séra ve všech lichých jamkách až do jedenácté jamky. 50 μ l

naředěného séra z 11. jamky se odstraní. Do druhé jamky se přenese 50 µl séra ředěného 1:30 a po důkladném promíchání se pomocí mikropipety přenese 50 µl do čtvrté jamky. Stejným způsobem se pokračuje v ředění séra ve všech sudých jamkách až do dvanácté jamky. 50 µl séra se z 12. jamky odstraní. K takto naředěnému séru se přidá do 1. a 2. jamky po 50 µl PFR+A a do všech ostatních jamek po 25 µl PFR+A a důkladně se promíchá (na třepače nebo poklepem na stěny destičky). Z 1. a 2. jamky se odstraní po 50 µl naředěného séra. V každé jamce je potom konečný objem naředěného séra 50 µl. Do každé jamky s naředěným sérem se přidá 25 µl redukovaného roztoku SLO. Po důkladném promíchání se inkubuje ve vlhké komoře v termostatu 15 min. při 37 °C. Po inkubaci se přidá do všech jamek po 25 µl 1% suspenze králičích erytrocytů. Obsah jamek se řádně promíchá a inkubuje 45 min. při 37 °C.

Při odečítání výsledků se odečte poslední jamka bez hemolýzy (matná): reciproká hodnota příslušného ředěného séra udává titr ASO v mj. Pro přehled se uvádí reciproké hodnoty ředění séra (tzn. titru ASO) v jednotlivých jamkách:

Jamka č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hodnota m.j.	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911

„Normální“ hodnoty ASO v séru jsou vysoce variabilní a závisí na věku vyšetřovaného, geografické oblasti, epidemiologické situaci, ročním období apod. Za horní hranici "normálních" hodnot ASO bývá obvykle pokládán titr 200 m.j. Normální hladina ASLO u dospělých je tedy nižší než 200 m.j., po angíně stoupá, u revmatické horečky zůstává zvýšená. Nemá smysl vyžadovat toto vyšetření u artrotických potíží starších osob, u nichž revmatická horečka není pravděpodobná. Daleko spolehlivější pro průkaz předchozí streptokokové infekce je zjištění signifikantního vzestupu titru ASO v séru pacienta. Vzestup ASO po streptokokové infekci obvykle dosahuje maxima mezi 3. a 5. týdnem po jejím začátku. Proto se doporučuje titrace nejméně 2 vzorků sér, odebraných s určitým časovým odstupem. Po streptokokových infekcích dojde k

vzestupu titru ASO zhruba v 80% případech. K zachycení většího počtu streptokokových infekcí je nutná titrace některé další streptokokové protilátky, např. antideoxyribonukleázy B. K nespecificky zvýšenému titru ASO může také dojít v přítomnosti lipidů a lipoproteinů v séru nebo v sérech kontaminovaných (tudíž ke stanovení ASO nepoužíváme chylózní séra). Interpretace výsledků vyžaduje znalost úrovně hladiny protilátek v populaci, kupř. koncentrace protilátek proti streptolysinu O – ASLO, ASO u dospělých vyšší než 250 m.j. (u dětí se 333 m.j.) se považuje za signifikantní.

Anti-streptolysin O (ASO) nebývá běžným stanovením na oddělení klinické biochemie. Tato metoda je typická spíše pro oddělení mikrobiologie. Nicméně některé biochemické laboratoře rozšiřují paletu vyšetření díky vysokokapacitním biochemickým analyzátorům. Do těchto nově zaváděných vyšetření na biochemii patří i stanovení ASO. Vlastní metoda je založena na aglutinaci latexových částic s navázaným streptolysinem O. Tato aglutinace latexových částic je úměrná koncentraci ASO ve vzorku a je stanovována turbidimetricky. Reagencie obsahuje jednak latexové částice s navázaným streptolysinem a dále chloridový pufr. Reagencí jedna je pufr, druhou reagencí je vlastní latex. Tento dvoureagenční postup prodlužuje stabilitu reagencí v přístroji, je ale umožněn především díky použitému typu přístroje, neboť ADVIA 1650 umožňuje práci s velmi malými reakčními objemy (0,08 ml celkový reakční objem) a dále pracuje s ředěnými séry. (3, 10, 14, 27)

3.4.6. Stanovení ADN B a antihyaluronidázy

Streptokoková deoxyribonukleasa B (DNAasa) je jedním z typů deoxyribonuklease produkovaných streptokoky skupin A. Patří mezi ty extracelulární produkty, které mohou po proběhlých streptokokových onemocněních vyvolat protilátkovou odpověď, která je zvláště výrazná u akutní revmatické horečky, glomerulonefritidy a streptokokových kožních infekcí. Stanovení hladiny protilátky proti streptokokové DNAase B je z diagnostického hlediska důležité a bylo zavedeno do rutinní diagnostiky streptokokových nákaz v mnoha laboratořích. Stanovení antideoxyribonukleasy B (ADNB) má své opodstatnění zvláště v těch případech, kdy

hladiny antistreptolysinu O zůstává nezvýšena, a proto je dalším vhodným testem pro podpoření diagnózy proběhlé streptokokové infekce. Oproti ASLO je protilátková odpověď proti deoxyribonuklease B ze streptokoků opožděnější a silnější; např. u kožní streptokokové infekce, kdy ASLO je zřídka pozitivní, je často zvýšen titer antistreptokokové DNAasy. Horní hranice normální hodnoty je do 200 IU/ml. Patologické zvýšení těchto hodnot můžeme najít tedy u kožních infekcí, které jsou vyvolané streptokoky skupiny A (impetigo, pyodermie, erysipel), u nefritidy a streptokokové angíny. Stanovení ADNB je tedy důležité zejména při podezření na pozdní následky. Hladina této protilátky klesá podstatně pomaleji než je tomu u ASLO. Vedle absolutních hodnot se hodnotí i dynamika protilátek.

Stanovení hladiny antihyaluronidázy, protilátky proti streptokokům skupiny A (ale též skupin B, C, a G) je důležité především u kožních infekcí, které jsou vyvolané streptokoky skupiny A (impetigo, pyodermie, flegmóna, erysipel). V těchto případech je titer antistreptolysinu většinou negativní. Dále zvýšený titer antihyaluronidázy (normální titer je nižší než 1 : 300) nacházíme u nefritidy a streptokokové angíny. (14, 33)

3.4.7. Biochemický test API 20 Strep

API 20 Strep je standardizovaný identifikační systém, který kombinuje 20 biochemických testů, poskytujících skupinovou nebo druhovou identifikaci většiny streptokoků a enterokoků a jejich příbuzných organismů.

API 20 Strep sestává z 20 mikrozkušavek obsahujících dehydratované substráty pro demonstraci enzymatické aktivity nebo fermentaci cukrů. Enzymatické testy se inokulují hustou suspenzí organismů, připravenou z čisté kultury, která se použije pro rekonstrukci enzymatických substrátů. Během inkubace produkuje metabolismus barevné změny, které jsou buď spontánní, nebo se zviditelní přidáním činidel. Fermentační testy se inokulují obohaceným médiem, které rehydratuje substráty cukrů. Fermentace sacharidů se detekuje změnou indikátoru pH. Reakce se odečítají podle odečítací tabulky, přičemž identifikace se získá porovnáním s analytickým přehledem profilů nebo pomocí identifikačního softwaru.

Testovací proužky API 20 Strep se skládají z 20 aktivních složek: VP (pyruvát

sodný), HIP (hippurová kyselina), ESC (eskulin, citrát železitý), PYRA (β -naftylamid pyroglutamové kyseliny), α GAL (6-brom-2-naftyl- α D-galaktopyranosid), β GUR (naftol ASBI-glukuronová kyselina), β GAL (2-naftyl- β D-galaktopyranosid), PAL (2-naftylfosfát), LAP(L-leucin- β -naftylamid), ADH (L-arginin), RIB (D-ribosa), ARA (L-arabinose), MAN (D-mannitol), SOR (D-sorbitol), LAC (D-laktóza, hovězího původu), TRE (D-trehalóza), INU (inulin), RAF (D-raffinóza), AMD (škrob) a GLYG (glykogen). Hemolytická reakce tvoří 21. test.

API 20 Strep není určen pro přímé použití na klinických nebo jiných vzorcích. Mikroorganismy, které mají být identifikovány, se musí napřed izolovat na vhodném kultivačním médiu podle standardních mikrobiologických technik. Poté, co se ověří, že izolovaný mikroorganismus, který se má identifikovat, patří do čeledi *Streptococcaceae* (Gramovým, katalázovým testem), se nabere dobře izolovaná kolonie a suspenduje se v 0,3 ml sterilní vody a dobře homogenizuje. Touto suspenzí se polije plotna Columbia agarů s ovčí krví nebo se tamponem asepticky potře vlastní povrch agarů. Plotna se inkubuje po dobu 24 hodin (± 2 hodiny) při 36 ± 2 °C za anaerobních podmínek.

Dále se připraví inkubační box (miska a víčko) a ve voštinových jamkách misky se rozprostře asi 5 ml destilované vody nebo demineralizované vody, čímž se vytvoří vlhká atmosféra. Na misku se zaznamená číslo, testovací proužek se vyjme z obalu a vloží se do inkubačního boxu. Poté se použije ampule API média (2 ml) nebo jakákoli zkumavka obsahující 2 ml destilované vody bez přísad. Tamponem se sebere kultura z předem připravené subkultivační plotny a připraví se hustá suspenze se zákalem větším než 4 dle McFarlanda. Tato suspenze se musí použít ihned po přípravě. Pak se do první poloviny testovacího proužku (testy VP až ADH) suspenze rozplní, přičemž musíme zabránit tvorbě bublin. Pro testy VP až LAP se aplikuje přibližně 100 μ l do každé jamky a pro test ADH se naplní pouze zkumavka. Do druhé poloviny proužku (testy RIB až GLYG) se do ampule s API médiem přenesou zbytek suspenze a dobře promíchá. Tato nová suspenze se rozplní pouze do zkumavek. Dále se jamky s podtrženými testy (ADH až GLYG) zakryjí minerálním olejem, aby se vytvořil konvexní meniskus. Položí se víko na misku a inkubuje se při 36 ± 2 °C za aerobních podmínek po dobu 4 - 4½ hodin pro první odečítání a po dobu 24 hodin (± 2 hodiny)

pro druhé odečítání, pokud je vyžadováno.

Po 4 hodinách inkubace se přidají činidla. K VP testu se přidá 1 kapka každého z VP 1 a VP 2. K HIP testu 2 kapky činidla NIN a k testům PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL a LAP se přidává 1 kapka každého z činidel ZYM A a ZYM B. Čeká se 10 minut a potom se reakce odečítá porovnáním s odečítací tabulkou. Při interpretaci výsledků testů je nutno vzít v úvahu anamnézu pacienta, zdroj vzorku, morfologii kolonie a mikroskopickou morfologii kmene, a pokud je to nezbytné, výsledky všech dalších provedených testů, zejména výsledky antimikrobiální citlivosti.

Streptococcus pyogenes má pozitivní reakce po 4/24 hodinách při 36 ± 2 °C hlavně u PYRA (98%), PAL a LAP (100%), ADH a LAC (99%), TRE (98%), AMD (61%) a hemolýza (98%). *Streptococcus agalactiae* má pozitivní reakce především u VP(100%), HIP (99%), β GUR (79%), PAL (96%), LAP a ADH (99%), RIB (98%), LAC (50%), TRE (87%) a hemolýza (75%).

Identifikace se získá pomocí číselného profilu, který se určí tak, že se testy ve výsledkové tabulce rozdělí do skupin po 3, přičemž každé se přidělí hodnota 1, 2 nebo 4. Sčítáním hodnot odpovídajících pozitivním reakcím v každé skupině se získá sedmimístný číselný profil. Identifikace se provádí s využitím databáze pomocí číselného profilu nebo pomocí identifikačního softwaru. (2, 22)

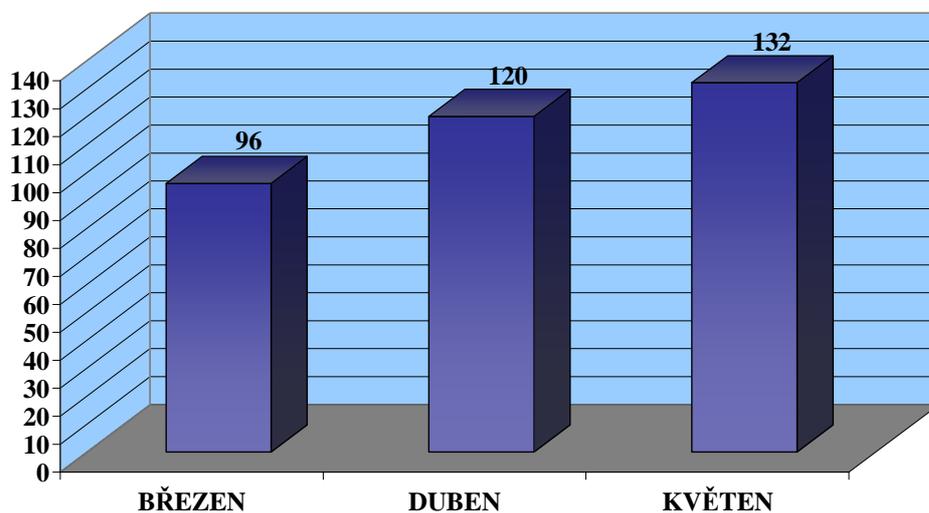
4. Výsledky

4.1. Základní informace

Pro vypracování grafů a tabulek byly použity údaje, které poskytla mikrobiologická laboratoř Laboma a.s. v Českých Budějovicích. Materiál pochází především z horních cest dýchacích (výtěry z krku, nosu), ale také z pochvy, rány a uretry. Věk mužů, žen (včetně gravidních) a dětí byl různý. Materiál se svází od praktických lékařů z celého jihočeského kraje, jimž jsou výsledky mikrobiologického vyšetření zasílány včetně možnosti terapie (citlivosti na antibiotika). Počty případů onemocnění různými typy beta-hemolytických streptokoků byly sledovány za časové období leden-prosinec 2007. Do grafů uvádím přehled počtu onemocnění způsobené beta-hemolytickým streptokokem skupiny A a B za rok 2007. Přehled počtu ostatních skupin beta-hemolytických streptokoků je uveden v příloze.

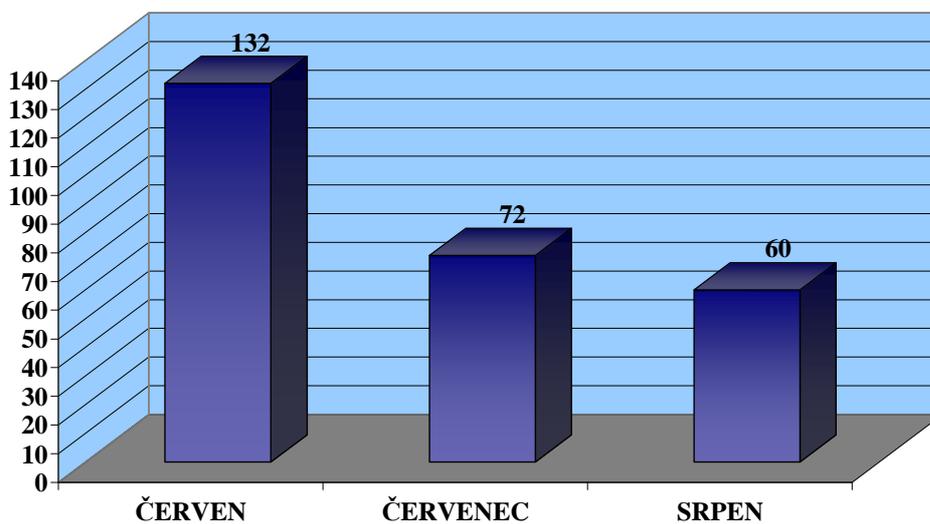
4.2. Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny A za rok 2007

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny A za jarní období roku 2007



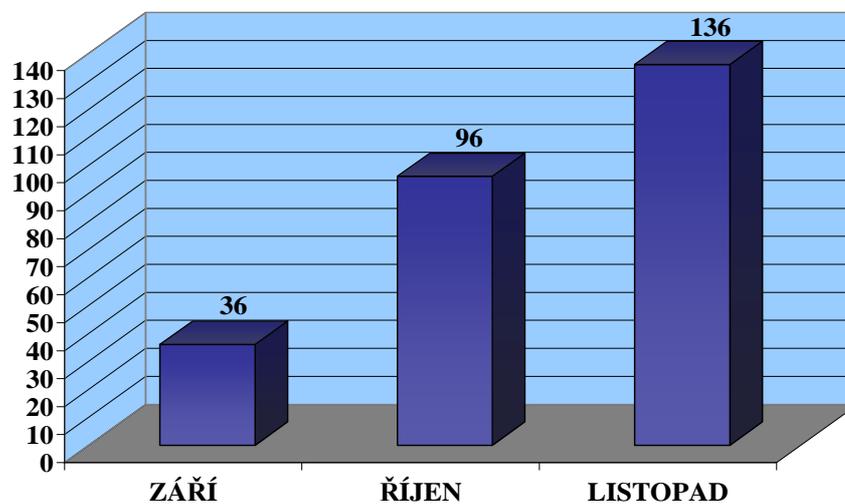
Graf č. 1
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny A za letní období roku 2007



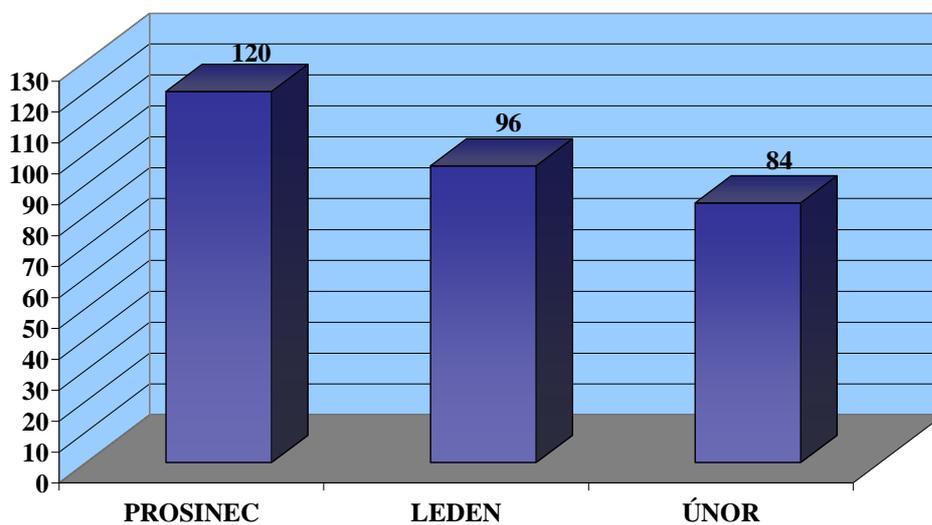
Graf č. 2
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny A za podzimní období roku 2007



Graf č. 3
Zdroj: vlastní výzkum

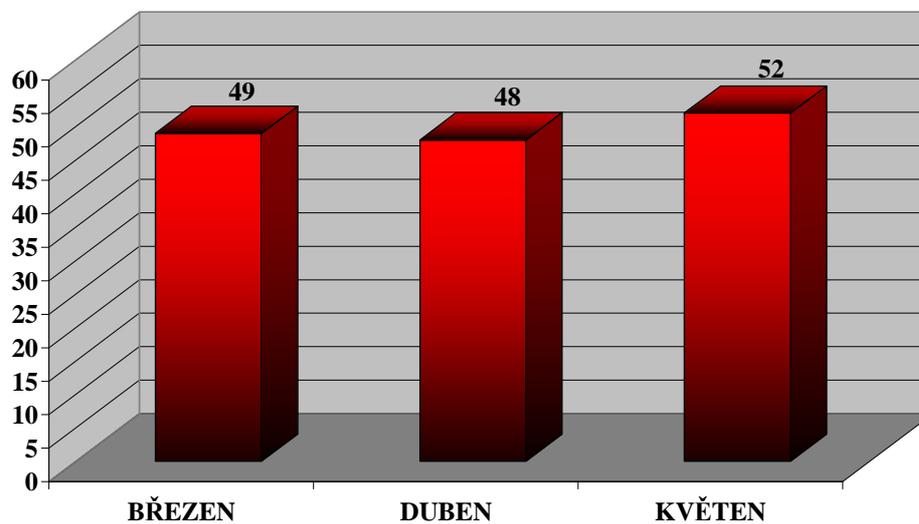
Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny A za zimní období roku 2007



Graf č. 4
Zdroj: vlastní výzkum

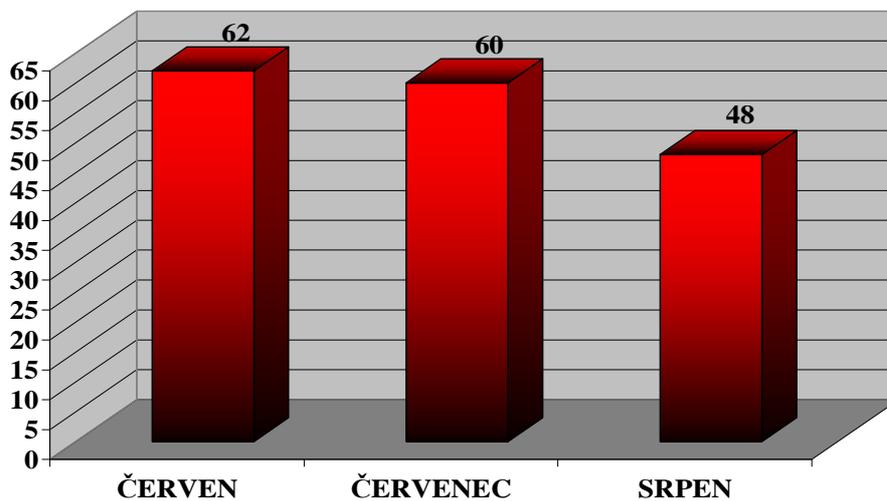
4.3. Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny B za rok 2007

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny B za jarní období roku 2007



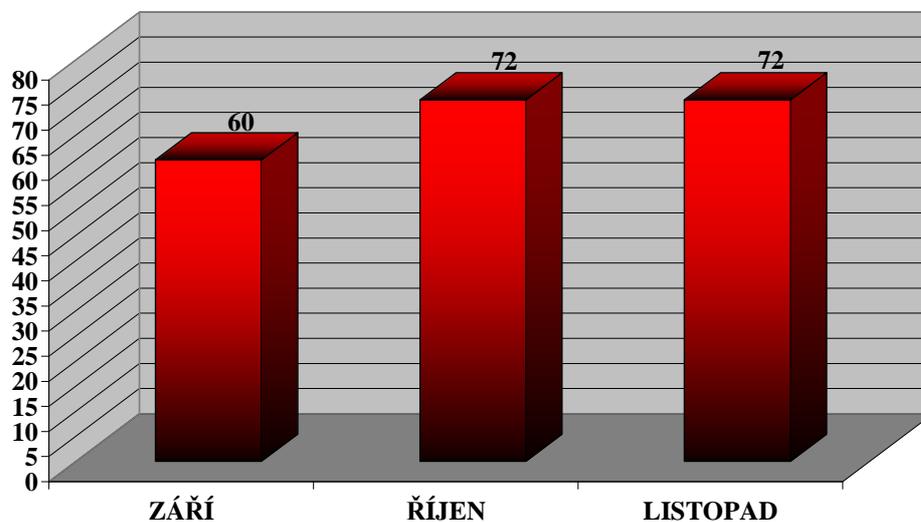
Graf č. 5
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny B za letní období roku 2007



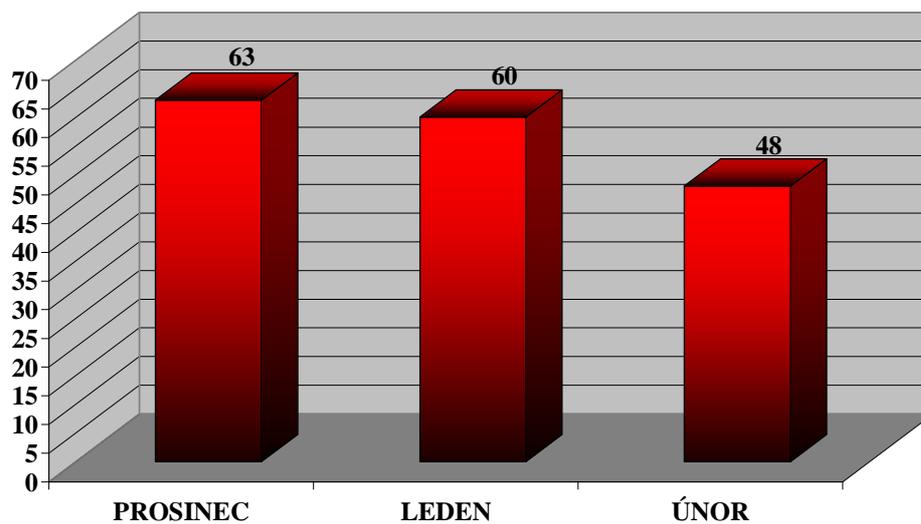
Graf č. 6
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny B za podzimní období roku 2007



Graf č. 7
Zdroj: vlastní výzkum

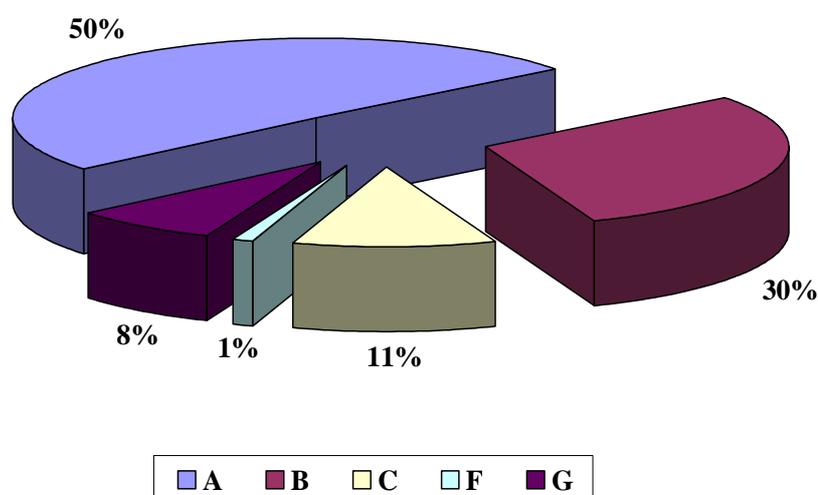
Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny B za zimní období roku 2007



Graf č. 8
Zdroj: vlastní výzkum

4.4. Procentuální zastoupení jednotlivých skupin beta-hemolytických streptokoků

Procentuální zastoupení záchytu beta-hemolytických streptokoků typu A, B, C, F a G za rok 2007



Graf č. 9
Zdroj: vlastní výzkum

4.5. Interpretace výsledků

Z mého zpracování údajů, které mi poskytla mikrobiologická laboratoř Laboma a.s., vyplývá, že největší zastoupení v počtu onemocnění beta-hemolytickým streptokokem má skupina A (*Streptococcus pyogenes*) – 50 % a skupina B (*Streptococcus agalactiae*) – 30 %. Třetí pozici zaujímá skupina C (11%). Nejmenší záchyt beta-hemolytických streptokoků je u skupiny G (8 %) a F (1 %). Výsledky byly zpracovány za rok 2007 z celkového počtu 2548 pacientů.

5. Diskuse

5.1. Shrnutí podkladů pro diskusi

Přímo do klinické praxe pronikají rychlé diagnostické postupy k detekci beta-hemolytických streptokoků především skupiny A, přesněji jejich antigenů, založené hlavně na inuoenzymatických reakcích. Vyšetřuje se opět výtěr z krku a v pozitivním případě se obvykle na vhodné podložce objeví barevný symbol. Tyto testy jsou vysoce specifické a natolik rychlé, že jsou hotovy ještě během přítomnosti pacienta. Pozitivní nález svědčí pro přítomnost velkého množství *S. pyogenes* v krku a tudíž pro nutnost nasadit specifickou léčbu. Při negativním výsledku by se pro nižší citlivost těchto testů měl odebrat nový výtěr na konvenční kultivaci.

Metodou poskytující nejspolehlivější výsledky je PYR-test (pro vyloučení nebo případné potvrzení skupiny A – *Streptococcus pyogenes*) v kombinaci s latexovou aglutinací, která nám přímo určí skupinu beta-hemolytických streptokoků. Kombinace těchto metod dává nejméně falešně pozitivních reakcí a je, dá se říci, nejrychlejší a nejspecifičtější. Samozřejmě těmto postupům musí předcházet klasická kultivace na krevním agaru, jež je pro klinickou diagnózu pacienta a jeho další léčení a terapii nezbytná.

Určité nevýhody naopak vykazuje bacitracinový test, jednak v poměrně časové náročnosti a jednak v citlivosti jednotlivých skupin beta-hemolytických streptokoků na disk bacitracinu, jak jsem již výše uvedla. Časová náročnost hraje významnou roli také u CAMP-testu sloužícího k určení skupiny B (*Streptococcus agalactiae*). Proto je třeba dát přednost sérologickým metodám a komerčně vyráběným soupravám před kultivačními testy, které se využívají jako speciální dourčovací postupy v rámci diagnostiky beta-hemolytických streptokoků.

Metoda stanovení ASLO je pro včasnou diagnostiku pozdních následků streptokokové infekce v široké laboratorní praxi dostačujícím postupem.

Největší význam však má typizace u streptokoků skupiny B a především u skupiny A, u nichž se typizace v praxi využívá pro účely epidemiologické, ke zjišťování zdroje nákazy, cest jejího šíření, při sledování účinnosti léčby apod.

Z mého zpracování údajů, které mi poskytla mikrobiologická laboratoř Laboma a. s., vyplývá, že největší zastoupení v počtu onemocnění beta-hemolytickým streptokokem má skupina A (*Streptococcus pyogenes*) a skupina B (*Streptococcus agalactiae*). Nicméně ani další skupiny beta-hemolytických streptokoků bychom neměli podceňovat.

Ačkoli dnes již dovedeme určit různé patogeny a přesně je identifikovat, dokonce víme, jaká onemocnění způsobují, jaký je jejich průběh a ve většině případů známe i léčbu, tato problematika by se přesto neměla brát na lehkou váhu. Jako v jiných odvětvích medicíny, také v mikrobiologii se klade důraz na prevenci a včasný záchyt onemocnění. Spolehlivá a rychlá diagnostika je pro pacienta jednou z nejlepších terapií, kterou můžeme využít.

5.2. Diskuse splnění cílů a hypotéz práce

Cíle práce byly stanoveny ve dvou oblastech: a) zjistit různé způsoby určení a detekce beta-hemolytických streptokoků, které jsou v současné klinické mikrobiologii nejčastěji využívány, b) poukázat na problematiku spojenou s tématem určování a diagnostika beta-hemolytických streptokoků. Splnění těchto cílů by mělo být ověřováno prostřednictvím třech hypotéz:

H1: K diagnostice jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků jsou v současné době klasické kultivační metody zcela postačující.

H2: K diagnostice jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků je nutné použít jak klasické kultivační metody, tak i speciální laboratorní metody a dostupné testy.

H3: K diagnostice jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků stačí použít speciální identifikační metody a testy.

Všechny tři hypotézy byly postupně zkoumány jak teoretickou, tak i praktickou částí práce. K přesné diagnostice jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků musí být z těchto tří hypotéz potvrzena pouze hypotéza H2. K objasnění jednotlivých postupů, metod a testů vedoucích k identifikaci beta-hemolytických streptokoků přispěla především metodika bakalářské práce.

6. Závěr

Určování skupinové příslušnosti izolovaného beta-hemolytického streptokoka patří dnes mezi pracovní postupy každé mikrobiologické laboratoře. Význam identifikace skupiny tkví především ve skutečnosti, že v převážné většině případů jsou streptokoková onemocnění horních cest dýchacích u lidí vyvolávána pouze beta-hemolytickým streptokokem skupiny A a jen tyto infekce předcházejí pozdní následky. Nosičství hemolytických streptokoků jiných skupin než A je však velmi časté. V klinickém a epidemiologickém sledování je proto určení jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků naprosto nezbytné.

V této práci jsem tedy popsala problematiku diagnostiky streptokoků, jednotlivé postupy a metody používané k určení skupiny beta-hemolytických streptokoků v klinické mikrobiologii. Mezi těmito základními i speciálními metodami se objevují jak metody levné, rychle, citlivé, tak i dražší, náročnější na provedení a ne tak specifické pro diagnostickou práci. Většina těchto testů je v současné době dostupná na trhu jako komerční mikrobiologické diagnostické soupravy, se kterými pracovníci laboratoří pracují velmi snadno.

V každém případě je jednoznačně jisté, že i na streptokoková onemocnění je možno, i za podmínek našeho vyspělého zdravotnictví, zemřít. Letální případy uveřejněné v odborných člancích to jasně dokazují. A proto bychom onemocnění způsobená streptokoky s beta-hemolýzou neměli nikdy podceňovat, i když v současné době již máme metody umožňující předcházení pozdním následkům.

Standardní kultivační vyšetření umožňuje získat výsledek do 48 hodin. Toto vyšetření preferujeme před užitím tzv. rychlých diagnostických testů, které využíváme pouze v časové tísní, jelikož u nich hrozí vyšší riziko falešně negativních výsledků.

7. Seznam použité literatury

1. BEDNÁŘ, Marek, FRAŇKOVÁ, Věra, et al. Lékařská mikrobiologie. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN neuvedeno
2. BioMérieux sa. Api 20 Strep. Lyon: 2004. 07625F
3. Biosystéme. Anti-Streptolysin O. Dostupné z: http://www.jktrading.cz/index_vypis_kultivace_all.php, 25. 2. 2008
4. Časopis sexus. Onemocnění působená *Streptococcus agalactiae*. (online). Dostupné z: <http://www.sexus.cz/clanek/1019-onemocneni-pusobena-streptococcus-agalactiae.html%20-->>, 25. 2. 2008
5. DiaMondiaL. Strep kit. Dostupné z: <http://www.diamondial.com/products/streptococcal-grouping-latex/>, 3. 4. 2008
6. DWIGHT, R. Johnson, KAPLAN, L. Edward. Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections. Geneva: WHO, 1996. 111 s. ISBN 92 4 154495 3
7. GREENWOOD, David. SLACK, C. B. Richard. PEUTHERER, F. John. et al. Lékařská mikrobiologie. Přel. J. Schindler. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 1999. 686 s. ISBN 80-7169-365-0
8. HEROLDOVÁ, M. DVOŘÁČKOVÁ, M. Půda s amikacinem k záchytu beta-hemolytických streptokoků. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie. Praha: 2006, roč. 55, č. 2, s. 73 – 75. ISSN 1210-7913
9. HOLEC, V. Pro gynekology: Vyšetření GBS aneb screening *Streptococcus agalactiae* v těhotenství. (online). Dostupné z: <http://www.zuova.cz/informace/mgt002.php>, 20. 4. 2008
10. ITEST plus s. r. o. Itest ASO. (online) Dostupné z: http://www.itest-plus.cz/editor/genhtml.pl?loc=itest-plus&table=soupravy_1_p, 12. 3. 2008
11. ITEST plus s. r. o. Latexaglutinační diagnostické soupravy. (online). Dostupné z: http://www.itest-plus.cz//editor/genhtml.pl?loc=itest-plus&table=diagnosticke_pripavky_cz, 12. 3. 2008

12. JINDRÁK, V. et al. Rezistence *Streptococcus pyogenes* k erytromycinu jako regionální problém. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: 1999, roč. 5, č. 7, s. 237–243, ISSN 1211264X
13. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bakteriology. *Streptococcus pyogenes*. (online). Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/streptococcus.html>, 17. 3. 2008
14. KESSLER, Siegfried. *Memorix – Laboratorní diagnostika*. Přel. J. Musil, 1. vyd. Praha: Scientia Medica, 1993. 256 s. Přel. z: *Memorix – Spezial, Labordiagnostik*. ISBN 80–85526-12–3
15. KOSINA, P. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. (online). Dostupné z: <http://kmil.trios.cz/kmil07062a.htm>, 12. 2. 2008
16. KRAMÁŘ, Radim. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2007, 73 s. ISBN 978–80-7394–021-8
17. KŘÍŽOVÁ, Pavla. Prezentace emm typizace a vyhlášení nových M-typů streptokoků skupiny A. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: 1997, roč. 6, č. 9, s. 33–34. ISSN 1211 – 7358
18. MĚCHUROVÁ, A. UNZEITIG, V. VLK, R. Doporučený postup při diagnostice a léčbě streptokoku skupiny B v těhotenství a za porodu. *Moderní gynekologie a porodnictví*. Praha: 2007, roč. 16, č. 1, s. 121 – 131. ISSN 1211–1058
19. MOTLOVÁ, Jitka. Invazivní onemocnění způsobené *Streptococcus pyogenes*. *Zprávy CEM*. Praha: 1997, roč. 6, č. 12, s. 20. ISSN 1211 – 1358
20. MOTLOVÁ, J. Klinický význam beta-hemolytických streptokoků sérologické skupiny C u člověka. *Praktický lékař*. Praha: 2004, roč. 84 , č. 12 , s. 726-731 . ISSN 0032–6739
21. MOTLOVÁ, J. Purulentní meningitida vyvolaná kmenem *Streptococcus suis* 2. *Zprávy CEM*. Praha: 1998, roč. 7, č. 9, s. 355 – 356. ISSN 1211- 7358
22. MURRAY, R. Patrick et al. *Manual of clinical mikrobiology-č.1*. 8. vyd. Washington, DC: ASM Press, 2003. 1212 s. ISBN 1–55581-255–4

23. ROŽNOVSKÝ, Luděk et al. Purulentní meningitida vyvolaná invazivní kmenem *Streptococcus pyogenes*. Zprávy CEM. Praha: 1995, roč. 4, č. 10, s. 9. ISSN neuvedeno
24. SCHETTLER, Gotthard et al. Repetitorium praktického lékaře. Přel. kolektiv překladatelů. 1. vyd. Praha: Galén, 1995. 982 s. Přel. z: Praktische Medizin von A-Z. ISBN 80-85824-18-3
25. STRAKOVÁ, L. KRÍŽOVÁ, P. Multilokusová sekvenační typizace streptokoků skupiny A izolovaných z invazivních onemocnění v České republice v roce 2003. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie. Praha: 2004, roč. 53, č. 4, s. 192 – 195. ISSN 1210-7913
26. STRAKOVÁ, Lenka. MOTLOVÁ, Jitka. Informace o konzultačním dnu NRL pro streptokoky a enterokoky. Zprávy CEM. Praha: 1998, roč. 7, č. 10, s. 402. ISSN 1211 – 7358
27. ŠPRONGL, L. Stanovení ASLO na ADVIA 1650. FONS. Praha: 2001, roč. 10, č. 1, s. 26. ISSN 1211-7137
28. URBÁŠKOVÁ, Pavla et al. Antibiotická rezistence u kmenů *Streptococcus agalactiae* izolovaných od gravidních žen a novorozenců v letech 2001– 2002. Praktický lékař. Praha: 2003, roč. 83, č. 4, s. 203–207. ISSN 0032-6739
29. URBÁŠKOVÁ, Pavla. Interpretace bakteriálních kultivačních nálezů z krku a nosu. Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie. Praha: 1997, roč. 6, č. 6, s. 27. ISSN 1211 – 7358
30. URBÁŠKOVÁ, Pavla. MOTLOVÁ, Jitka. Vyšetření citlivosti k penicilinu u druhu *Streptococcus agalactiae*. (online). Dostupné z: <http://www.szu.cz/cem/zpravy/default.htm>, 12. 3. 2008
31. URBÁŠKOVÁ, Pavla. Rezistence k antibiotikům u *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* a *Moraxella catarrhalis* v České republice v roce 1996 a 1997. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. Praha: 1998, roč. 4 , č. 10 , s. 292–298. ISSN 1211-264X

32. URBÁŠKOVÁ, Pavla. Vzestup rezistence *Streptococcus pyogenes* k makrolidovým antibiotikům v České republice. Praktický lékař. Praha: 1999, roč. 79, č. 11, s. 636–640. ISSN 0032–6739
33. VOTAVA, Miroslav et al. Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80–902896–6–5
34. VOTAVA, M. Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. 1. vyd. Brno: Hortus, 1999, 404 s. ISBN 80–238-5058X
35. VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie obecná. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80–86850-00–5
36. VOTAVA, Miroslav, ONDROVČÍK, Petr. Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2002. 91 s. ISBN 80–210-1805–4
37. Test-line s. r. o. PYRstrip. (online). Dostupné z: <http://www.test-line.cz/cz/product.php?pp=144>, 20. 3. 2008
38. Živné půdy. Columbia. (online). Dostupné z: http://www.zivnepudy.cz/Uvodni2/___data/page/59/Columbia_3.pdf?MySourceSession=74d23305a913316abb8c928fe1b65259, 20. 3. 2008

8. Klíčová slova

Diagnostika

Beta-hemolytické streptokoky

Streptococcus pyogenes

Streptococcus agalactiae

Kultivační metody

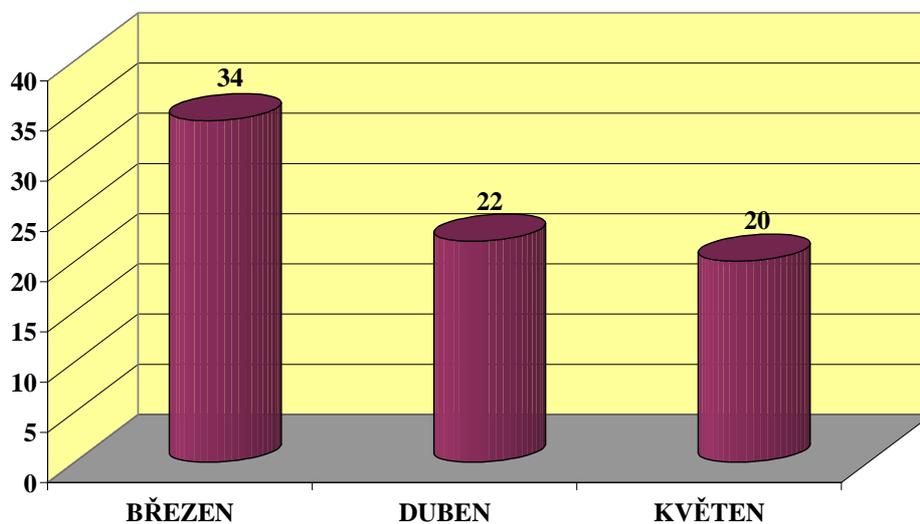
PYR-test

Latexová aglutinace

9. Přílohy

9.1. Grafy

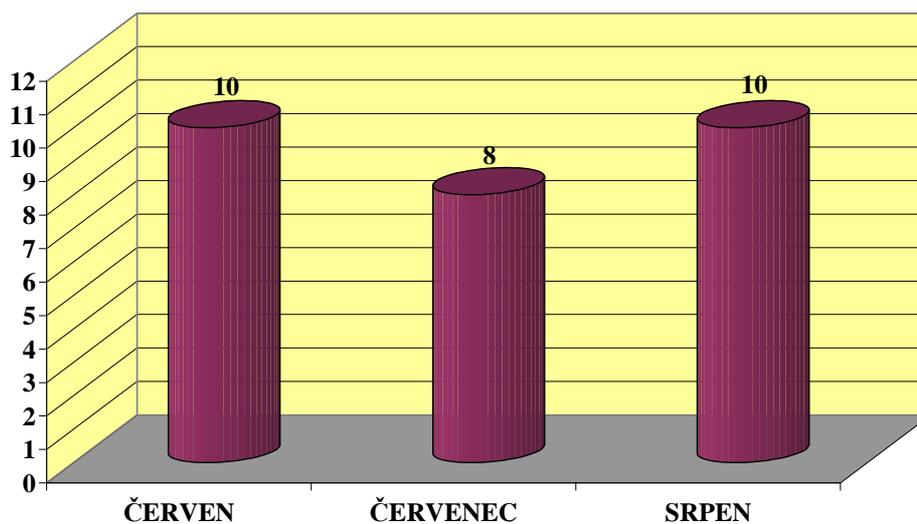
Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny C za jarní období roku 2007



Graf č. 10

Zdroj: vlastní výzkum

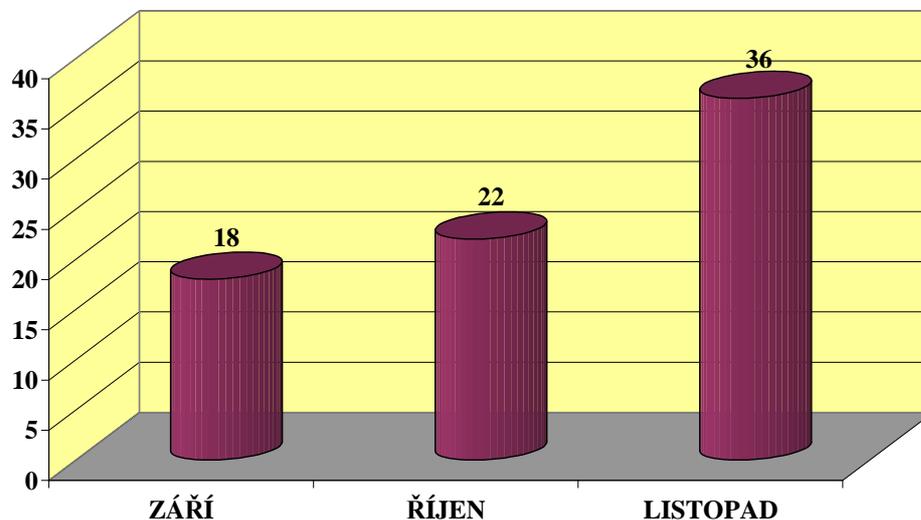
Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny C za letní období roku 2007



Graf č. 11

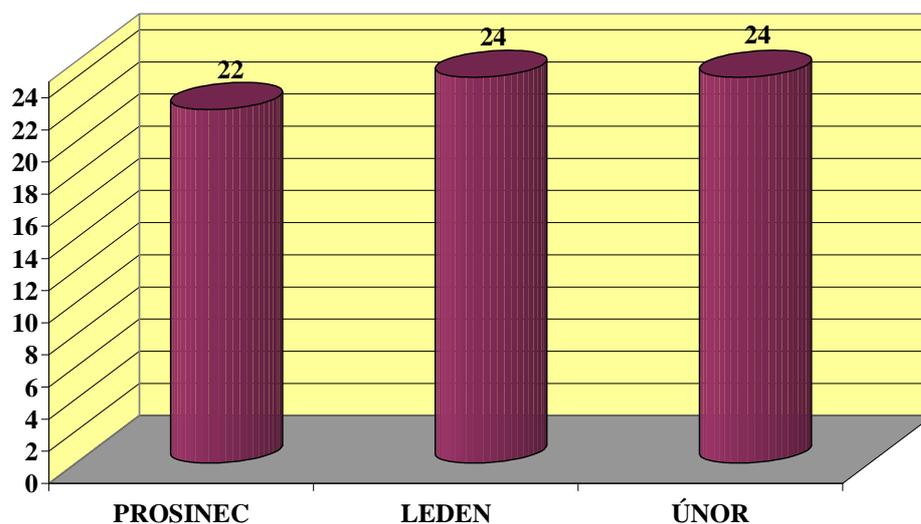
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny C za podzimní období roku 2007



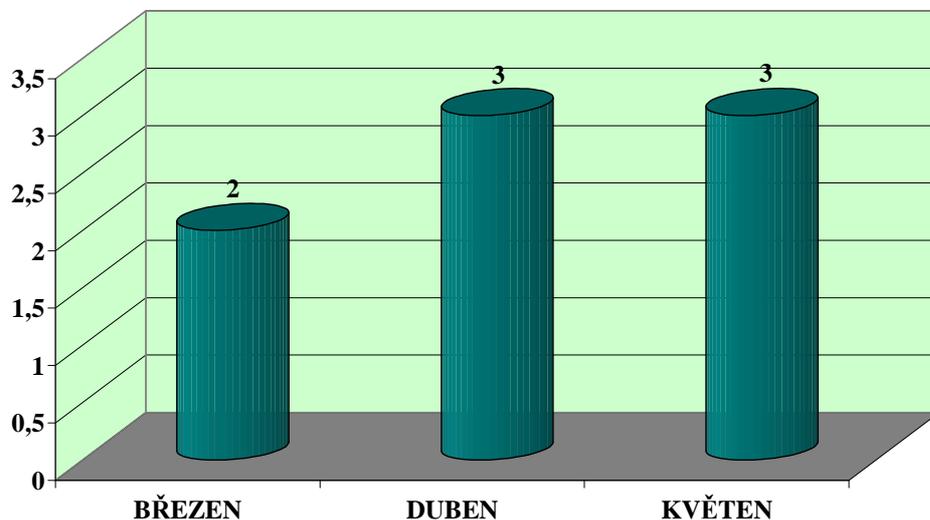
Graf č. 12
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny C za zimní období roku 2007



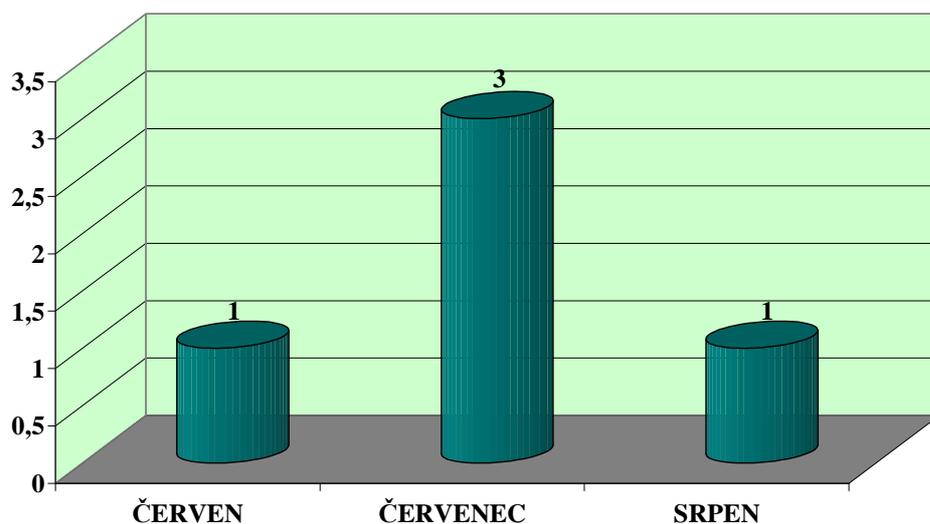
Graf č. 13
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny F za jarní období roku 2007



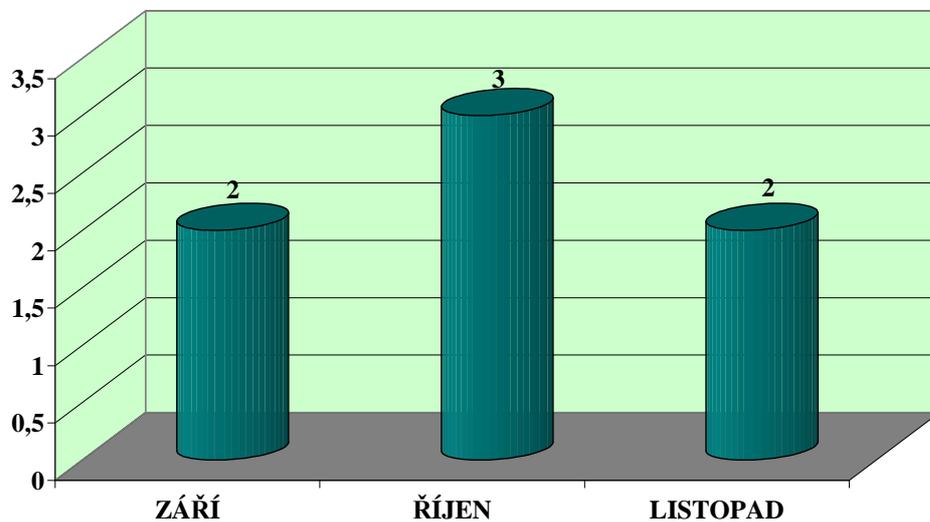
Graf č. 14
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny F za letní období roku 2007



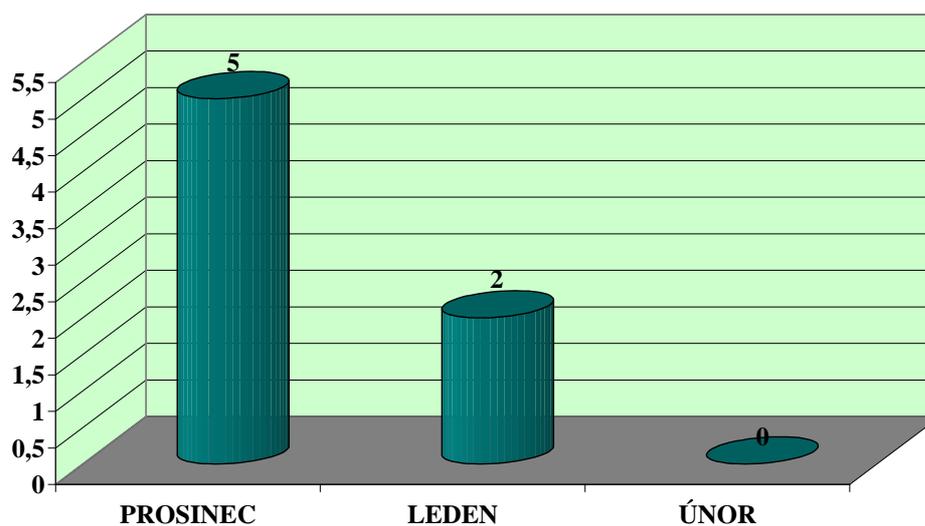
Graf č. 15
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny F za podzimní období roku 2007



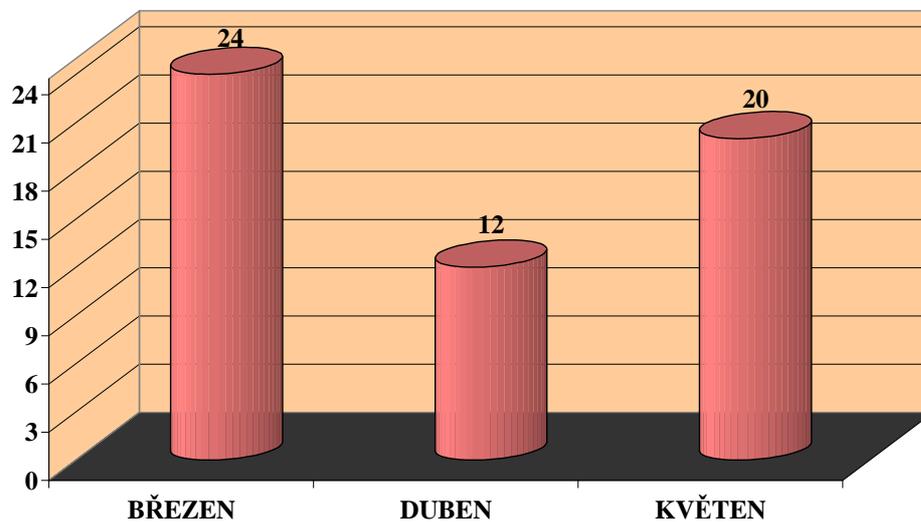
Graf č. 16
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny F za zimní období roku 2007



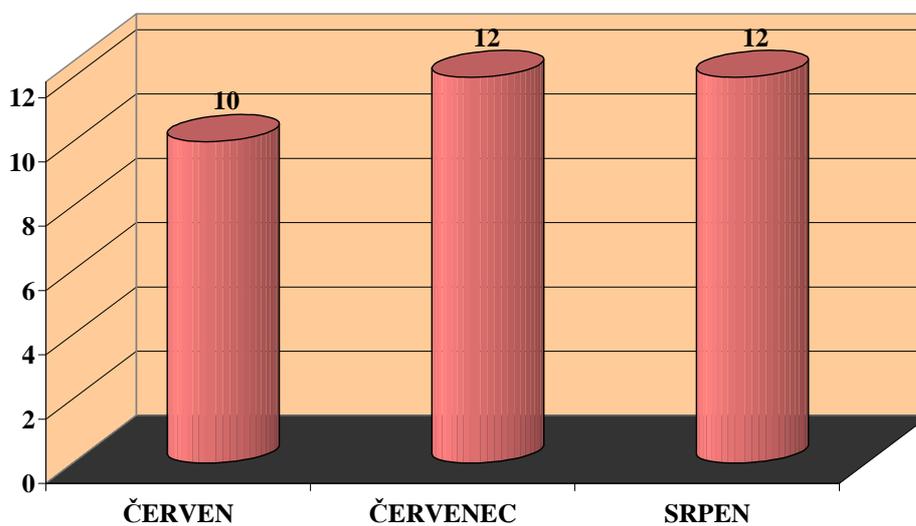
Graf č. 17
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny G za jarní období roku 2007



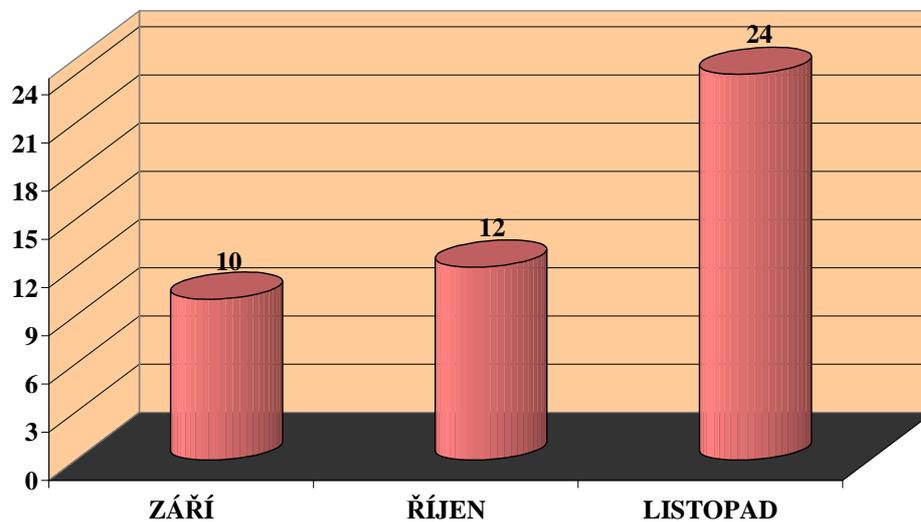
Graf č. 18
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny G za letní období roku 2007



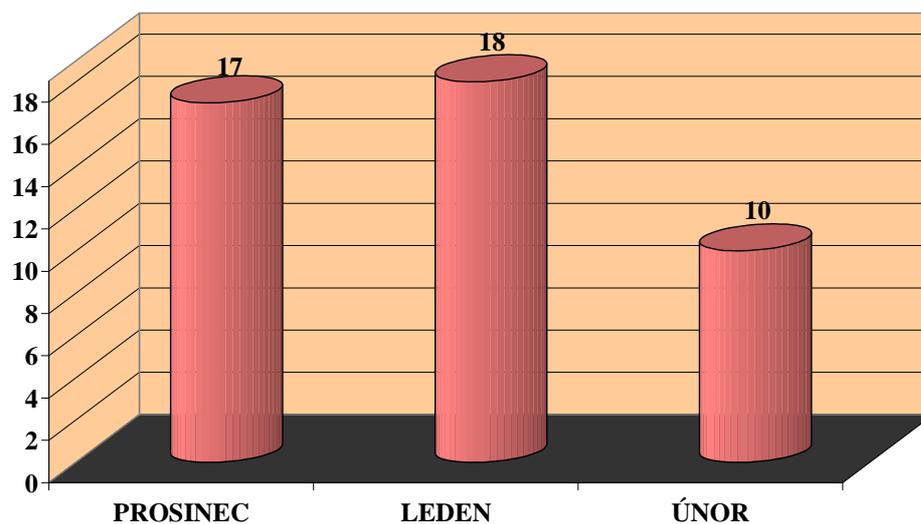
Graf č. 19
Zdroj: vlastní výzkum

Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny G za podzimní období roku 2007



Graf č. 20
Zdroj: vlastní výzkum

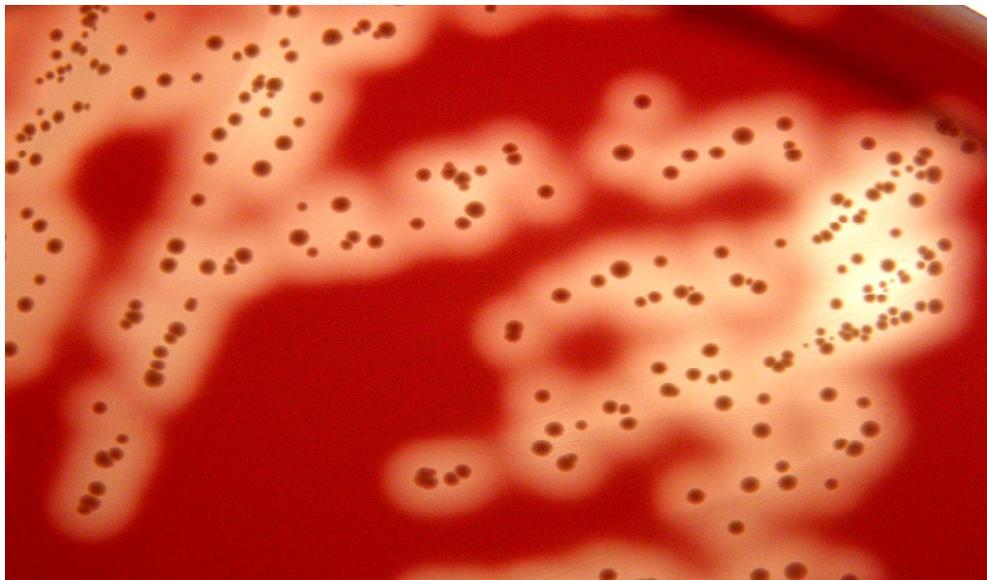
Záchyt beta-hemolytických streptokoků skupiny G za zimní období roku 2007



Graf č. 21
Zdroj: vlastní výzkum

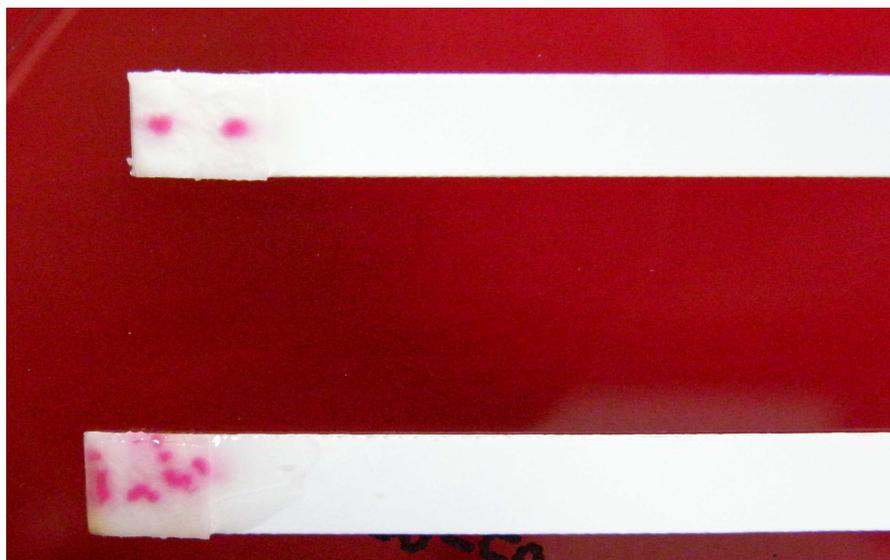
9.2. Fotografie

Streptococcus pyogenes



Obrázek č. 1
Zdroj: vlastní výzkum

Pozitivní reakce u PYR – testu



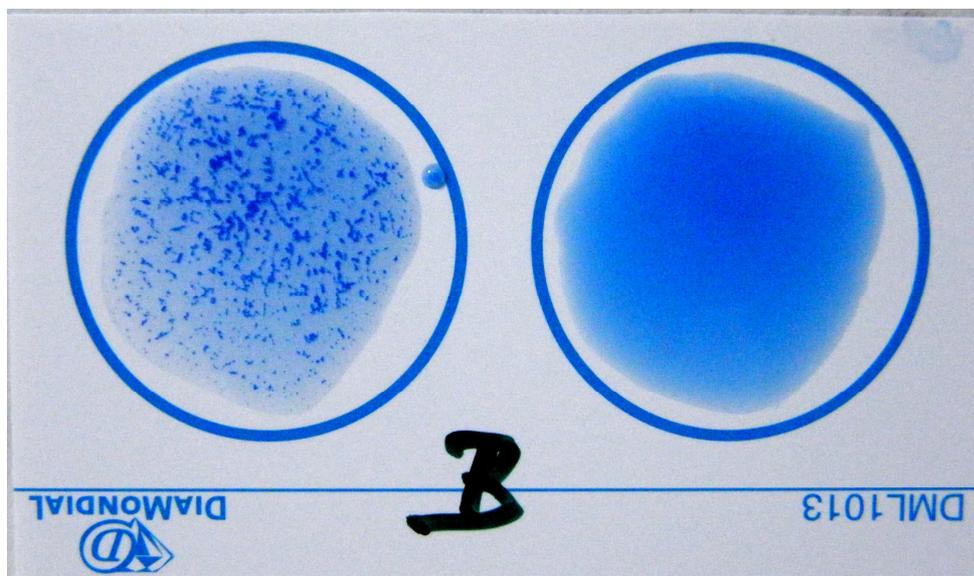
Obrázek č. 2
Zdroj: vlastní výzkum

Komponenty obsažené v diagnostické soupravě latexové aglutinace



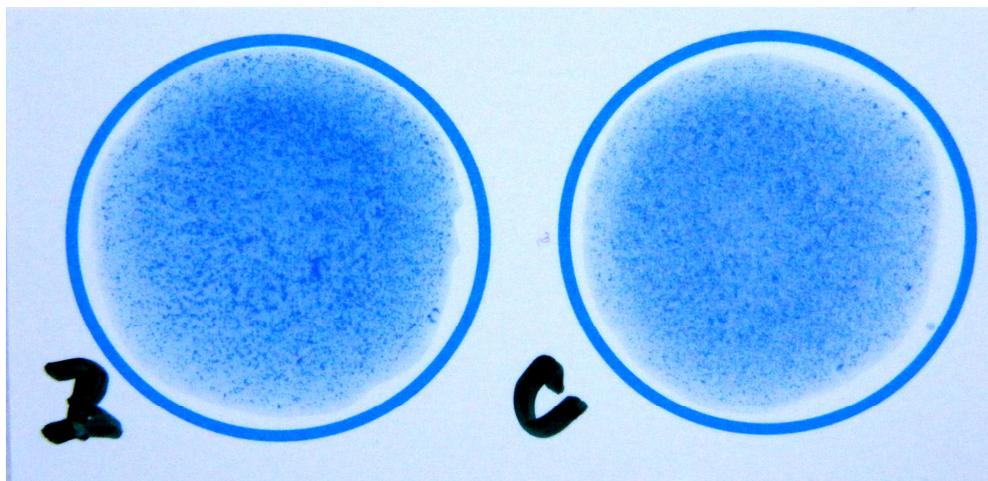
Obrázek č. 5
Zdroj: vlastní výzkum

Pozitivita a negativita u latexové aglutinace skupiny B (*Streptococcus agalactiae*)



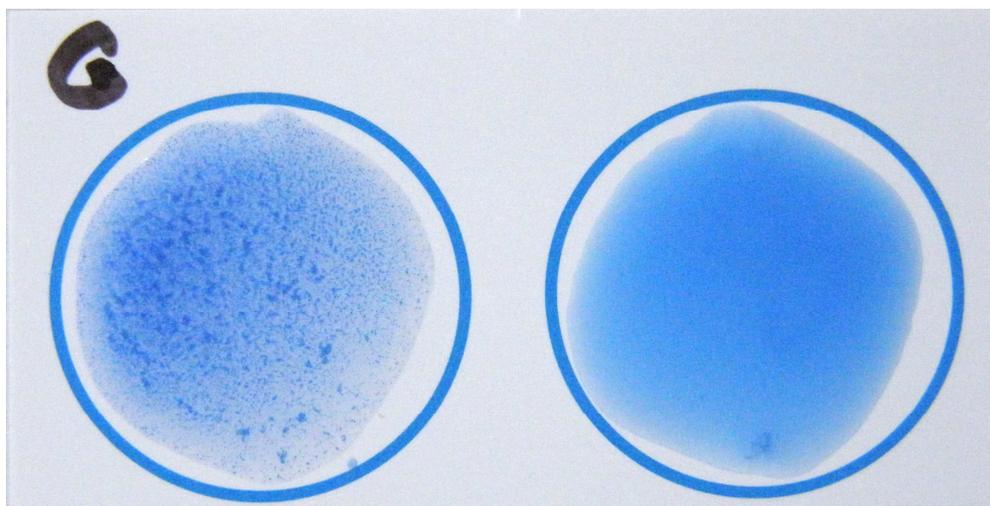
Obrázek č. 6
Zdroj: vlastní výzkum

Pozitivní latexová aglutinace u skupiny B a C



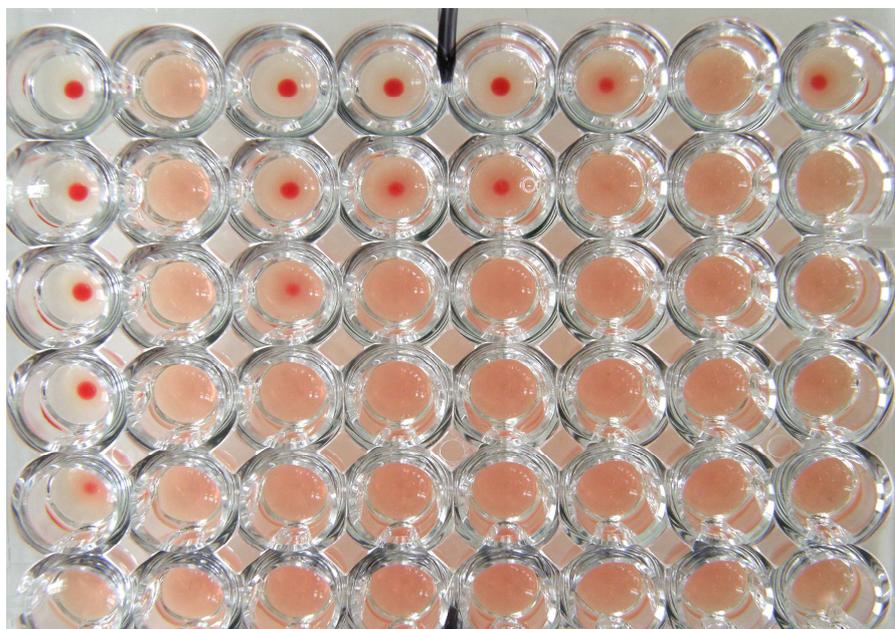
Obrázek č. 7
Zdroj: vlastní výzkum

Pozitivita a negativita u latexové aglutinace skupiny G



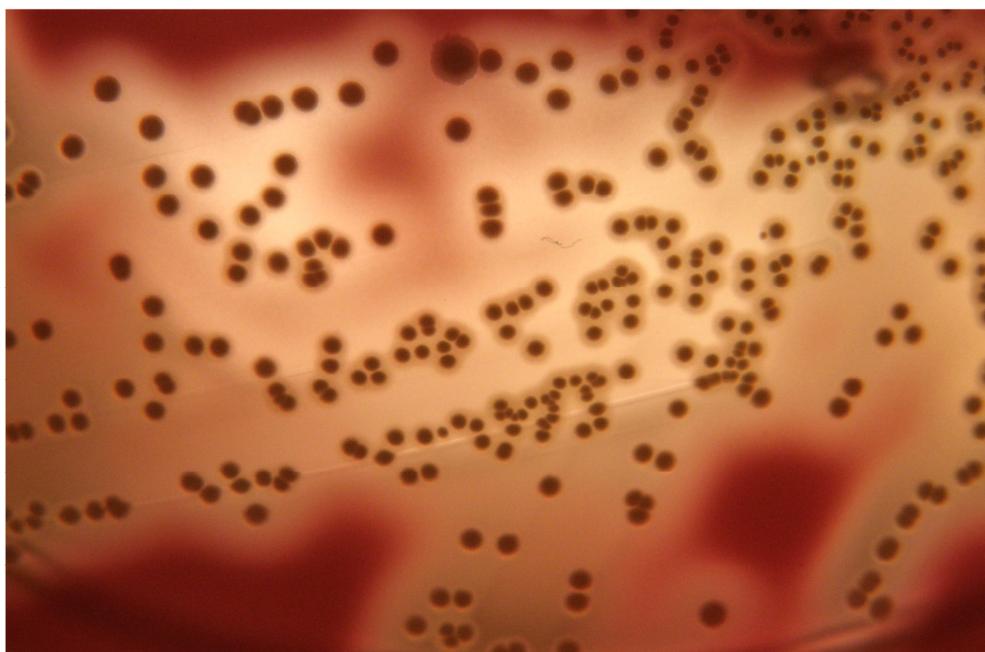
Obrázek č. 8
Zdroj: vlastní výzkum

Mikrotitrační destička pro titraci antistreptolysinu O v séru



Obrázek č. 9
Zdroj: vlastní výzkum

Streptococcus pyogenes

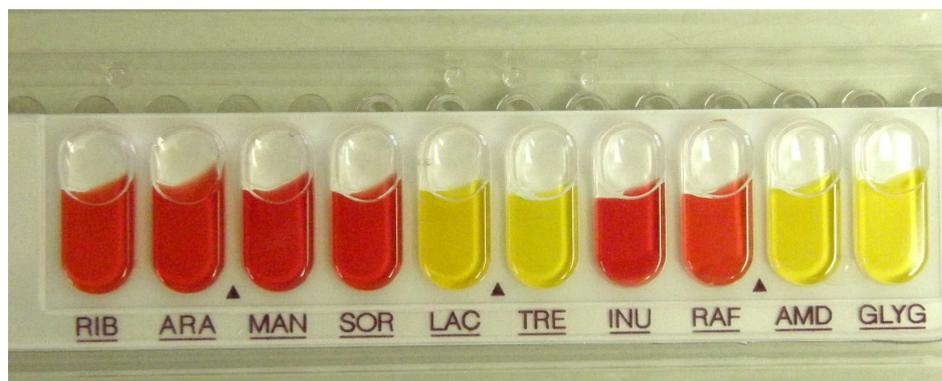


Obrázek č. 10
Zdroj: vlastní výzkum

Biochemický test API 20 Strep



Obrázek č. 11
Zdroj: vlastní výzkum



Obrázek č. 12
Zdroj: vlastní výzkum

9.3. Seznam použitých zkratk

GAS (group A streptococcus)	streptokok skupiny A
SOF	sérový opacitní faktor
MLST	multilokusová sekvenační typizace
ST	sekvenční typy
Spe	streptokokové pyrogenní exotoxiny
MHC (major histocompatibility komplex)	hlavní histokompatibilitní komplex
APC (antigen-presenting cell)	buňka předkládající antigen
Ig	imunoglobulin
TSLs (toxic shock-like syndrome)	syndrom streptokokového toxického šoku
ASLO (ASO)	antistreptolysin O
GBS (group B streptococcus)	streptokok skupiny B
NRL	národní referenční laboratoř
G+	gram – pozitivní
ADNB	antideoxyribonukleasa B
EH (enhanced hemolysis)	zvýšená hemolýza
KA	krevní agar
SLO	streptolysin O
IU (m.j.)	mezinárodní jednotka
ČR	Česká republika
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
WHO (World Health Organization)	Světová zdravotnická organizace
SZÚ	Státní zdravotní ústav

