

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Kultivace a citlivost kmenů *Streptococcus pyogenes* ze sliznice
nosohltanu a uší u dětí a jejich citlivost na β -laktamová antibiotika a
makrolidy**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce: Jaroslava Sivoková
Vedoucí práce: MUDr. Jarmila Bečvářová

7. 5. 2009

Abstrakt

The topic **Cultivation and sensitivity of the stems of *Streptococcus pyogenes* from the mucus of nasopharynx and ears in children and their sensitivity to β -lactam antibiotics and makrolids** occupied my mind because I was interested in the question if the increased consumption of antibiotics and the following resistance occur also in this bacterium.

Except for gaining practical knowledge on cultivation and identification of *Streptococcus pyogenes* bacteria the objective of the thesis was the investigation of its sensitivity to β -lactam antibiotics and makrolids. Further I was interested in how the doctors for children and teenagers proceed in case of suspicion of streptococcus disease of upper airways. Also this topic was one of the objectives.

The thesis is composed of two parts, theoretical and practical ones. In the theoretical part I first came out of available information on *Streptococcus pyogenes* bacteria. I describe its morphology and characteristics, factors of pathogenicity and virulence. This information is used during the cultivation of bacteria and its following identification. Further I mention the diseases which are caused by pyogenic streptococci. The part is also the description of antibiotics which are recommended for the treatment of the diseases caused by this bacteria. The second part includes the methods of cultivation and identification of *Streptococcus pyogenes* which are used in microbiology laboratory Laboma mikrobiologická laboratoř s.r.o. (Laboma microbiology laboratory Inc.). Identification methods come out of the application of PYR-test, latex agglutination and the use of identification system Api 20 Strep in ambiguous results.

The results gained in microbiology laboratory show that the capture of *Streptococcus pyogenes* bacteria in diseases of upper airways created 4,4% from all smears sent into the laboratory. These diseases showed seasonal occurrence with the maximum in spring and winter. The results of sensitivity have shown that the sensitivity to penicillin was in 100% and to erythromycin in 91.6%. Cross-resistance between erythromycin and clindamycin occurred in 57 cases (4.5 %). According to my

investigation *Streptococcus pyogenes* caused otitis in 13 cases (2.7%). The highest occurrence of otitis caused by *Streptococcus pyogenes* emerged in spring. The stems isolated from ear mucos were sensitive to penicilin in 100% and to erythromycin in 92.3%. These results apply to the material sent to microbiology laboratory Laboma mikrobiologická laboratoř s.r.o. (Laboma microbiology laboratory Inc.)

To gain a complete picture I visited 20 doctors for children and teenagers who were willing to fill in my questionnaire. After the evaluation I found out that all questioned doctors are waiting for the results of cultivation and sensitivity of the stem to antibiotics if the clinical state of a patient is not serious. In preference they apply penicilin. Control smear is carried by most of the doctors only in recurrent infections. From the data of the laboratory I found out that three doctors send the material to the culture investigation and the following sensitivity of the stem to antibiotics after the failure of treatment in a patient.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Kultivace a citlivost kmenů *Streptococcus pyogenes* ze sliznice nosohltanu a uší u dětí a jejich citlivost na β -laktamová antibiotika a makrolidy** 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, a to v nezkrácené podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 7. 5. 2009

Podpis studenta:

Poděkování

Zde bych chtěla poděkovat především své školitelce MUDr. Jarmile Bečvářové za odbornou pomoc, ochotu a trpělivost, kterou mi věnovala při tvorbě této práce, dále MUDr. Radimu Kramářovi, CSc. za ochotu poradit mi v odborných věcech a také personálu laboratoře Laboma mikrobiologická laboratoř s.r.o.

Obsah

Úvod	8
1. Současný stav	9
1.1 <i>Streptococcus pyogenes</i>	9
1.1.1 Morfologie a fyziologie	10
1.1.2 Faktory patogenity a virulence	11
1.1.3 Odolnost <i>Streptococcus pyogenes</i> vůči imunitním mechanismům	13
1.1.4 Obrana organismu proti streptokokovým infekcím	14
1.1.5 Patogenita	15
1.1.6 Epidemiologie	18
1.1.7 Terapie	19
2. Cíl práce a hypotézy	25
2.1 Cíl práce	25
2.2 Hypotézy	25
3. Metodika	27
3.1 Charakteristika souboru	27
3.2 Odběr a transport vzorků do mikrobiologické laboratoře	28
3.2.1 Odběr materiálu	28
3.2.2 Transport materiálu	28
3.3 Kultivace	29
3.3.1 Kultivační zpracování výtěrů z krku	29
3.3.2 Kultivační zpracování materiálu z ucha	31
3.4 Diagnostický průkaz <i>Streptococcus pyogenes</i>	32
3.4.1 PYR-test	32
3.4.2 Latexová aglutinace	33
3.4.3 Vyšetření antistreptolyzinu O	35
3.4.4 Identifikační systém Api 20 Strep	36
3.5 Stanovení citlivosti na antibiotika	37
3.6 Dotazník	39

4. Výsledky	40
4.1 Výskyt bakterie <i>Streptococcus pyogenes</i> za rok 2008 a její citlivost na beta-laktamová antibiotika a makrolidy	40
4.1.1 Výskyt <i>Streptococcus pyogenes</i> v horních cestách dýchacích a jeho citlivost	40
4.1.2 Výskyt <i>Streptococcus pyogenes</i> v uších a jeho citlivost	43
4.2 Výsledky získané dotazníkem	45
5. Diskuze	48
5.1 Hypotéza 1	48
5.2 Hypotéza 2	48
5.3 Hypotéza 3	49
6. Závěr	50
7. Klíčová slova	52
8. Seznam použitých zdrojů	53
9. Přílohy	58
9.1 Obrázky	58
9.2 Dotazník	59
9.3 Použité zkratky	60

Úvod

Téma **Kultivace a citlivost kmenů *Streptococcus pyogenes* ze sliznice nosohltanu a uší u dětí a jejich citlivost na beta-laktamová antibiotika a makrolidy** jsem si vybrala s ohledem na současnou situaci, kdy používání nových antibiotik a jejich zvýšená spotřeba vede ke stoupající rezistenci i u dříve dobře citlivých bakterií, jakou je *Streptococcus pyogenes*. Zajímala mě také otázka, zda se vliv zvýšené spotřeby antibiotik projeví i na četnosti výskytu *Streptococcus pyogenes* u těchto onemocnění.

Pyogenní streptokok má tvar kulatý až lehce ovoidní. Koky se shlukují do dvojic až delších řetízků. *Streptococcus pyogenes* způsobuje z 10-30 % onemocnění horních cest dýchacích u dětí předškolního a školního věku. Většinou se jedná o lokalizované hnisavé infekce. Z onemocnění horních cest dýchacích se podílí na vzniku tonzilitid a faryngitid, způsobuje také spálu a může být i původcem otitidy, na jejímž vzniku se podílí asi z 10 %. Protože mohou vznikat pozdní následky těchto infekcí, jako akutní glomerulonefritida a revmatická horečka, je nutné jim předcházet včasnou diagnostikou a léčbou. Jako lék první volby je doporučen penicilin. Pokud se vyskytne přecitlivělost k beta-laktamovým antibiotikům jsou lékem volby makrolidy.

Při podezření na onemocnění vyvolané kmeny *Streptococcus pyogenes* je proto důležité, aby byl zaslán výtěr z krku nebo ucha do laboratoře ke zpracování a k identifikaci původce s následným určením citlivosti. Jen cílenou a účelnou terapií lze zamezit narůstající rezistenci a ovlivnit již tak vysokou spotřebu antibiotik.

1. Současný stav

Streptococcus pyogenes je původcem převážně respiračních infekcí. U dětí způsobuje nejčastěji tonsilitidu, faryngitidu a spálu. Při epidemickém výskytu těchto onemocnění může jeho záchyt vzrůst až na 30%. Některé kmeny vyvolávají také otitidu, infekce kůže, pneumonii, meningitidu a sepsi. Pyogenní streptokoky se také vyznačují schopností přivodit pozdní následky svých nálezů, mezi něž řadíme akutní glomerulonefritidu a revmatickou horečku. (2, 31)

1.1 *Streptococcus pyogenes*

Bakterie *Streptococcus pyogenes* se řadí do čeledi *Streptococcaceae* a do rodu *Streptococcus*. Streptos řecky znamená řetěz. Pyogenní streptokok roste v koloniích, jež se po obarvení v mikroskopu jeví jako řetízky, které mohou být různě tvarované a dlouhé. (31)

Streptococcus pyogenes je možné dělit podle přítomnosti specifického polysacharidu v buněčné membráně, podle Gramova barvení a podle hemolýzy. Poslední dělení, jak ukázala praxe, je velmi užitečné. Rozeznáváme tři druhy hemolýzy, a to alfa, beta a gama. Alfa-hemolýzu označujeme také jako viridaci. Její podstatou je přeměna krevního barviva hemoglobinu na verdoglobin, který má zelenou barvu. Způsobuje ji například *Streptococcus pneumoniae*. Beta-hemolýza se vyznačuje odbarvením erytrocytů. Na kultivační půdě je možné rozlišit úplnou a neúplnou beta-hemolýzu. Úplná hemolýza se projeví projasněním půdy i v okolí hemolytické kolonie, kdežto neúplná je v jejím okolí zakalená. Úplnou hemolýzou se vyznačuje právě *Streptococcus pyogenes* a další beta-hemolytické streptokoky ze skupin C, G a F, neúplnou pak *Streptococcus agalactiae*. U gama-hemolýzy se krevní agar neprojasní a barevně nezmění. Bakterie se pak nazývají nehemolytické. (31)

Dále dělíme streptokoky podle přítomnosti specifického polysacharidu C. Vyskytuje-li se tato substance v buněčné stěně bakterií, je možné je rozlišit podle Lancefieldové na třídy A-Z. Polysacharid C chybí některým viridujícím streptokokům a

také *Streptococcus pneumoniae*. Podle Lancefieldové se *Streptococcus pyogenes* řadí do skupiny A. (26,31)

Gramovo barvení patří mezi základní diagnostická barvení. Tímto barvením se bakterie rozdělí do dvou skupin na základě toho, zda si dokáží udržet barvivo, které přijaly i v přítomnosti alkoholu nebo acetonu. Fixovaný preparát bakterií se nejprve obarví krystalovou violetí, která po proniknutí do bakteriální stěny zbarví bakterie tmavě modře až modrofialově. Po přidání Lugolova roztoku se v buňkách vytvoří komplex barviva s jodem. Poté se preparát oplachuje alkoholem nebo acetonem. Bakterie schopné si komplex barviva s jodem udržet se nazývají grampozitivní. Ty, z nichž se odplaví, nesou název gramnegativní. Tyto bakterie se musí ještě dobarvit kontrastním barvivem. Jedná se o zředěný fuchsin, což je slabé červené barvivo, které neovlivní tmavě modrou barvu grampozitivních bakterií. Z toho tedy plyne, že gramnegativní bakterie mají v mikroskopu červenou barvu. Vzhledem k principu Gramova barvení se streptokoky řadí mezi grampozitivní bakterie. (30)

1.1.1 Morfologie a fyziologie

Streptococcus pyogenes je pravidelně kulatý až lehce ovoidní kok o průměru 0,6-1 μm . Koky jsou uspořádány do dvojic až delších řetízků a většinou se tvoří při delší inkubaci v tekuté půdě. Stěna bakteriální buňky grampozitivních bakterií se skládá z cytoplazmatické membrány, silné vrstvy peptidoglykanu, která je protkaná řetězci kyseliny teichoové. Do buněčné stěny jsou zakotveny polysacharid C a antigeny bílkovinné povahy, z nichž nejdůležitější je protein M. (15,30,31)

Pyogenní streptokok poměrně dobře snáší vyschnutí. K jeho usmrcení je třeba teploty 60°C po dobu 30 minut. (31)

Podle vztahu ke kyslíku se většina streptokoků, mezi nimi také *Streptococcus pyogenes*, řadí mezi fakultativně anaerobní bakterie. To znamená, že rostou lépe v přítomnosti kyslíku, ale jsou schopny přežít i v jeho nepřítomnosti. Dále lze bakterie třídit podle schopnosti produkovat enzymy. Jedná se o katalázu rozkládající peroxid vodíku a oxidázu, která pomáhá při oxidačních pochodech. Takto se *Streptococcus*

pyogenes zařadí mezi bakterie kataláza i oxidáza negativní. Navíc je schopen produkovat enzym pyrrolidonylaminopeptidázu (PYRázu). Pomocí ní se laboratorně diagnostikuje. Pyogenní streptokok přeměňuje glukózu na kyselinu mléčnou, která je jeho hlavním metabolickým produktem. Při glykolýze netvoří plyn. Je schopen vytvořit z argininu amoniak, dokáže hydrolyzovat hipurát a eskulin, ale není vybaven schopností oxidovat ribózu jako ostatní streptokoky. (15,26,30,31)

1.1.2 Faktory patogenity a virulence

Faktory virulence *Streptococcus pyogenes* je možné rozdělit na exogenní faktory a na faktory vázané na buňku. Sem patří protein M, anebo pouzdro z kyseliny hyaluronové. Mezi exogenní faktory pak řadíme hemolyziny, enzymy hyaluronidázu, deoxyribonukleázu (DNázu), streptokinázu, C3b-peptidázu, C5a-peptidázu a pyrogenní exotoxiny. (15,26,30,31)

M protein je hlavním faktorem virulence. Kmeny, které ho neobsahují, označujeme jako nevirulentní. Má fibrilární strukturu vyčnívající z buněčné stěny. Podle antigenní stavby M proteinu rozeznáváme více jak 100 serotypů, proti nimž existuje typově specifická imunita daná přítomností opsonizačních protilátek. M protein působí adhezenčně, kdy umožňuje navázání streptokoka na povrch kůže a sliznic. Působí také antifagocytárně. Po proniknutí do organismu chrání bakterii před fagocytózou. Protein M má i invazivní účinky, které mu pomáhají pronikat tkáněmi. Podobné vlastnosti mají i bílkoviny podobné M proteinu jako Mrp, Enn a další. (15,31)

Pouzdro z kyseliny hyaluronové je důležitým faktorem virulence. Je téměř neimunogenní, protože se kyselina hyaluronová běžně nachází v pojivové tkáni savců. Imunitní systém ji tedy považuje za tělu vlastní. Toto pouzdro chrání bakterii před opsonizací a následnou fagocytózou. Umožňuje také adhezi na povrch epitelii. (15,31)

Mezi hemolyziny *Streptococcus pyogenes* patří streptolyzin O a streptolyzin S. Streptolyzin O je oxygenlabilní. Účinným se stává pouze v redukované formě. Toxický je především pro leukocyty. Tím, že se streptolyzin naváže na cholesterol, se včlení do cytoplazmatické membrány. V ní se vytvoří pór, kterým do buňky proniká voda.

Buňka se tím usmrtí. To znamená, že nepoškozují neutrofilů přímo, ale rozruší membrány jejich granul. Následkem toho se hydrolázy, které obsahují, vylijí do cytoplazmy. Streptolysin O má kardiotoxické vlastnosti a je antigenní. Tvoří se proti němu protilátky, které se nazývají antistreptolysin O (ASLO). Slouží k retrospektivní diagnostice nedávno proběhlé streptokokové infekce a také případných následků poststreptokokových nákaz. Naproti tomu streptolysin S je oxygenstabilní a neantigenní. Na krevním agaru vyvolává zónu úplné hemolýzy. Je odpovědný za smrt leukocytů, které fagocytovaly pyogenní streptokoky. Působí poruchy permeability membrán. Uvnitř buněk napadá mitochondrie. (15,30,31)

Hyaluronidáza umožňuje bakterii *Streptococcus pyogenes* pronikat tkáněmi díky štěpení mezibuněčného tmelu a pojiv. Umí štěpit i pouzdro z kyseliny hyaluronové. Imunitní systém proti ní vytváří protilátky. (15,30,31)

DNáza snižuje hustotu hnisu vzniklého z rozpadlých leukocytů tím, že nepolymerizuje DNA. Neporušené buňky nenapadá. Známe čtyři antigenní typy, z nichž typ B se používá jako antigen v nepřímé diagnostice protilátky proti deoxyribonukleáze B (antideoxyribonukleáza B = ADN_B). (15,30,31)

Streptokináza působí jako fibrinolysin a váže tkáňový plasminogen. Na povrchu bakterie se pak vytváří plasmin, který aktivuje metaloproteinázy a kolagenázy, a tím se umožní průnik pyogenního streptokoka skrz fibrinové bariéry. (15,30,31)

Streptococcus pyogenes může tvořit streptokokové pyogenní exotoxiny (Spe) několika typů. Geny toxinů typu A a C jsou kódovány a přenášeny do bakterie prostřednictvím DNA bakteriofága. Dříve se SpeA a SpeC souhrnně nazývaly spálový neboli erytrogenní Dickův toxin. Gen pro toxin typu B je chromozomální a tedy přítomný ve všech pyogenních streptokokích. Spe působí jako superantigeny. Propojují molekulu MHC II. třídy na buňkách předkládajících antigen (APC) s receptorem na T-lymfocytech. Dojde tak k masivní aktivaci T-buněk a uvolnění velkého množství cytokinů. Následuje horečka a aktivace komplementu, systému srážlivosti a fibrinolýzy. Tím vzniká syndrom streptokokového toxického šoku. Začnou se uvolňovat zánětlivé mediátory, jako cytokiny a leukotrieny. (15,31)

1.1.3 Odolnost *Streptococcus pyogenes* vůči imunitním mechanismům

Pyogenní streptokok využívá řadu nástrojů, jak se ubránit imunitním mechanismům člověka, jeho nespecifické i specifické imunitě.

a) obrana proti nástrojům nespecifické rezistence

Streptococcus pyogenes se brání fagocytóze produkcí leukocidinů, které fagocyty usmrtí, a účinku komplementu tím, že zabrání jeho aktivaci. (30)

Kyselina teichoová v buněčné stěně streptokoka reaguje s C3b složkou komplementu, čímž se stává součástí C3-konvertázy. Následuje dokončení aktivace komplementu alternativní cestou. Streptokok se tomu snaží zabránit tvorbou inhibitoru aktivace komplementu. Tím je M-protein, který na sebe ze séra naváže regulační faktor H. Ten má schopnost zrychlit rozpad C3-konvertázy. (30,31)

Streptococcus pyogenes ještě produkuje enzymy C3b-peptidázu a C5a-peptidázu, které dokáží specificky rozložit C3b a C5a složky komplementu. C5a-peptidáza zabraňuje chemotaxi leukocytů. (30,31)

Pyogenní streptokok se účinně brání proti fagocytóze produkcí leukocidinů, které usmrcují neutrofile a makrofágy. K zabití fagocytů může dojít buď ještě před samotnou fagocytózou, nebo až po pohlcení streptokoků. Smrtící účinek má také DNáza B. Prakticky nejúčinnější způsob, jak se bakterie vyhne fagocytóze, je tvorba pouzdra. *Streptococcus pyogenes* tvoří své pouzdro z kyseliny hyaluronové, která se podobá hostitelským polysacharidům. Antifagocytárně působí také M-protein díky schopnosti navázat na sebe ze séra regulační faktor H. To vede v okolí streptokoků k degradaci C3b složky komplementu, čímž se zamezí opsonizaci. (30)

b) obrana proti nástrojům specifické imunity

Pyogenní streptokok využívá pro oklamání lymfocytů antigenní mimikry, antigenní kamufláž a pro potlačení imunitní reakce tvorbu superantigenů a schopnost vázat Fc-fragment imunoglobulinu G (IgG). (30)

Případ, kdy se používá shodná sekvence aminokyselin u streptokoka a v hostitelských proteinech, se nazývá antigenní mimikry. Nejčastěji se vyskytuje zkřížená reakce mezi streptokokem ze skupiny A a myokardem. U disponovaných lidí se začne vytvářet protilátka proti peptidu srdečního svalu. To je také příčina vzniku revmatické horečky. Ačkoliv se antigenní mimikry docela často vyskytují, nejsou pro mikroby příliš užitečné, protože nedokázaly zabránit vzniku imunitní antibakteriální reakce. (30)

Výhodnějším je pro streptokoka svůj povrch pokryt molekulami pocházejícími z hostitele, tedy taktika kamufláže. Protein G na povrchu streptokoka na sebe naváže Fc-fragment imunoglobulinů. Jedná se však o imunitně bezcenné postavení. Zablokuje se totiž přístup T-lymfocytů či specifických protilátek ke *Streptococcus pyogenes* nebo k infikované buňce. (30)

Tvorbou superantigenů pyogenní streptokok potlačuje imunitní reakci. Superantigeny se váží na molekulu MHC a na receptor T-lymfocytů, ale na poněkud odlišná místa. Bez ohledu na antigenní specifitu dojde k aktivaci řady buněk imunitního systému, které začnou produkovat obrovské množství cytokinů. Následuje zničení imunitních buněk a tvorba autoimunitních protilátek. Tímto mechanismem se zničí účinná obrana proti infekci. (30)

1.1.4 Obrana organismu proti streptokokovým infekcím

Organismus si vytváří protilátky především proti M proteinu. Imunita je přísně typově specifická, proto je možné onemocnět streptokokovou anginou opakovaně. Nákaza může být způsobena jiným typem M proteinu, než proti kterému má člověk protilátky, nebo také stejným typem, pokud byla nasazena antibiotická léčba včas a organismus si nestačil protilátky vytvořit. Protilátky proti M proteinu typu IgA brání adhezi streptokoků na epitelie a kolonizaci sliznic. IgG protilátky povrch streptokoků opsonizují, zabraňují jejich průniku do tkání a množení v krvi. (15,31)

Buňky imunitního systému vytvářejí také protilátky proti pyrogenním exotoxinům A, B a C. Tyto protilátky chrání pouze před vznikem spalového exantému,

nikoli před vznikem streptokokové anginy. Byl prokázán ochranný účinek protilátek proti dalším povrchovým strukturám a také proti C5a-peptidáze. (15,31)

1.1.5 Patogenita

Onemocnění probíhají od inaparentních infekcí až po onemocnění s těžkým, až smrtelným průběhem. Dají se rozdělit na primární a sekundární infekce a na jejich pozdní následky. Streptokoky způsobují převážně lokalizované hnisavé infekce, invazivní onemocnění a také pozdní následky těchto nákaz. (18,31)

a) Primární streptokokové infekce

Do této skupiny patří především respirační infekce a infekce kůže a měkkých tkání. Streptokoky mohou také způsobit pneumonii. Nejčastěji způsobují anginu, která probíhá jako faryngitida s tonzilitidou, nebo bez ní. Postihuje převážně děti předškolního a mladšího školního věku s četností na podzim a v zimě. Angina může být vyvolána i jinými mikroorganismy, například streptokoky jiných skupin a respiračními viry. *Streptococcus pyogenes* je však nejčastějším bakteriálním původcem. Virovou a bakteriální anginu od sebe téměř nelze odlišit. Klinicky se streptokoková angina projevuje bolestí faryngu, zduřením a zarudnutím podčelistních uzlin, horečkou a také nepřítomností kašle a rýmy. Angina může být také alimentárního původu, pak se přidružuje nevolnost, zvracení a průjem. (2,18,26,31)

Jestliže pyogenní streptokok produkuje Spe, tak se k příznakům anginy připojuje i typická vyrážka a malinový jazyk. Onemocnění se pak nazývá spála. Spálový exantém se nejvýrazněji projevuje na podbřišku, vnitřní straně stehen, bočních stranách trupu, v podpažní a loketní jamce. Exantém se nevyskytuje v okolí úst. Po vyrážce dochází k olupování kůže, které je závislé na intenzitě exantému. (15,17,31)

Streptokok ze skupiny A vyvolává také kožní hnisavé infekce (pyodermie). Nejčastěji se vyskytují v létě. Jsou velmi nakažlivé a jako pozdní následek se u nich může projevit akutní glomerulonefritida. Mezi streptokokové pyodermie patří například impetigo a růže (erysipelas). Jsou většinou způsobeny jinými M-serotypy. Impetigo je

povrchová lokalizovaná infekce kůže, vyskytující se u dětí od dvou do pěti let. Může být vyvoláno pyogenním streptokokem spolu se *Staphylococcus aureus*, ale ten je schopný tuto infekci způsobit i sám. Impetigo se projevuje jako nebolestivé puchýře naplněné žlutým hnisem a zasychajícími strupy. Vzniká při celkových infekcích, intoxikacích a podvýživě. (2,15,18,31)

Erysipel vzniká i při nepatrném poškození epidermis, kdy mohou streptokoky pronikat hlouběji do pokožky. Objevují se celkové příznaky, zimnice, horečka, bolest hlavy a nevolnost. Místně vzniká zánět kůže a podkoží, vyskytuje se zčervenání, pálení, svědění, bolestivost, otok a šíření léze po kůži. Mohou se vyskytnout puchýřky, pak se jedná o bulózní erysipel, nebo nekróza, a pak jde o gangrenózní erysipel. Převážně se růže vyskytuje na bérce či obličeji. Bývají postiženy i regionální uzliny, u kterých dochází ke zduření. Erysipel má sklon k recidivám, které většinou postihují stejné místo, ale s mírnějším průběhem. (15,16,31)

b) Sekundární streptokokové infekce

Tyto infekce vznikají jako komplikace primárních infekcí. Streptokok ze skupiny A tedy může vyvolat peritonzilární absces, sinusitidu, lymfadenitidu, záněty středouší, endokarditidu, meningitidu, sepsi, septický a toxický šok a flegmónu. (18,31)

Záněty středouší postihují především děti kojeneckého a batolícího věku. Důvodem je kratší Eustachova trubice, která je orientovaná horizontálně, proto se v ní hromadí sekret a snadněji dochází k jejímu ucpání. Nejčastěji, asi z 80-90%, otitidy způsobuje *Streptococcus pneumoniae*, méně často s výskytem 10-20% pak *Streptococcus pyogenes*. V klinickém projevu většinou otitidě předchází respirační infekce. Ta se může šířit z nosohltanu Eustachovou trubicí, nebo hematogenně. Při infekci horních cest dýchacích postihuje zánět nejprve Eustachovu trubicí, proto ve středouší vzniká podtlak. Infekce se poté rozšíří na sliznici středouší a mastoidálního výběžku. Na začátku se otitida projevuje celkově nespecifickými příznaky, až poté se objevuje otalgie s lokálními projevy. (2,5,9)

Sinusitidu ze 70% vyvolává *Streptococcus pneumoniae*, méně často i *Streptococcus pyogenes*. Většinou vzniká po infekci respiračního traktu, která je

virového původu. Mezi klinické projevy patří zvýšená teplota, bolest hlavy, která se zhoršuje při předklonu, dále bolest zubů horní čelisti, hnisavý výtok z nosu, ztížená nosní průchodnost, porucha čichu, huhňavost, kašel a celková únava. (2,4,35)

Lymfadenitida je hnisavý zánět mízních uzlin, jenž následuje po hnisání ran, kdy se streptokoky rozšíří do regionálních mízních uzlin. U hlubokých, invazivních a komplikovaných streptokokových infekcí se může vyskytnout seps. (31)

V posledních letech se k bakteriémii připojuje syndrom podobný toxickému šoku (TSLS, nazývá se také syndrom streptokokového toxického šoku). Způsobuje ho kmen *Streptococcus pyogenes*, který produkuje SpeA nebo SpeB a současně se uplatňuje i M protein typu 1 nebo 3. Příznaky TSLS jsou vysoká teplota a vyrážka. Ta se projevuje ve formě difúzní erythrodermie, méně často jako bulózní exantém nebo drobné petechie. Jako další příznaky se vyskytují nevolnost, zvracení, průjem, bolest svalů. Pokožka na dlaních a ploskách se začíná olupovat 1-2 týdny po začátku onemocnění. (19,26,31)

c) Pozdní následky streptokokových nákaz

Většinou se projevují po nesprávně nebo pozdě léčené primární streptokokové infekci i inaparentní. K rozvoji vzniku pozdních následků přispívá jak vliv prostředí, který umožňuje opakovanou expozici streptokokovým infekcím, tak i genetická predispozice nemocného. Mezi pozdní následky patří revmatická horečka a akutní glomerulonefritida. (15,18,26,31)

Pro revmatickou horečku je typický horečnatý nehnisavý zánět srdce, kdy je postižen endokard, myokard a také mitrální chlopeč, a zánět kloubů, kdy se jedná o stěhovavou arthritid více kloubů. Vzácně dochází k postižení centrálního nervového systému (chorea minor) a kůže. Revmatická horečka se projevuje za několik týdnů po angině vyvolané pyogenním streptokokem. Vyskytují se u ní celkové známky zánětu, jako zvýšená sedimentace a zvýšená hladina CRP. Lze také prokázat zvýšenou a neklesající hladinu protilátek proti streptokokovým antigenům například proti antistreptolyzinu O (ASLO). Častěji se revmatická horečka vyskytuje u infekcí způsobených tzv. „revmatogenními“ serotypy jako M 1, 3, 5, 14, 16, 18, 19 a 24. Tyto

kmeny vyrůstají v mukoidních koloniích. Revmatická horečka má sklon k recidivám, zvláště při další streptokokové nákaze, která může mít i inaparentní průběh. (15,18,31)

Akutní glomerulonefritida vzniká po infekci tzv. „nefritogenními“ serotypy jako M 2, 6, 49, 55, 57 a 60, které vyvolávají spíše pyodermie, a M 1, 4, 12 a 25 způsobující anginy. Byly popsány i případy zkřížených reakcí mezi „nefritogenními“ kmeny streptokoků a tkání ledvin. Poškození ledvin je, jak se zdá, vyvoláno spíše usazováním imunokomplexů v glomerulech. Akutní glomerulonefritida nemá sklon k recidivám, ale může přecházet do chronické formy. (15,18,31)

1.1.6 Epidemiologie

Streptokoková onemocnění patří mezi nejčastější bakteriální infekce ve světě, zvláště pak jejich respirační průběhy. V České republice je povinné hlášení výskytu spály a erysipelu. Počet případů spály v České republice se ročně pohybuje mezi 15 000-25 000, erysipel se vyskytuje přibližně ve 3 000 případech za rok. TSLs se u nás za poslední dva roky vyskytl pouze dvakrát. Smrtnost je však velmi vysoká až 50%. (3,16,17,18,19)

Zdrojem infekce je nemocný člověk nebo nosič, jen výjimečně to může být zvíře. Nemocný člověk je nakažlivý ještě 1-2 dny po zahájení antibiotické léčby. U nosičů se pyogenní streptokok vyskytuje na místech, kde nejeví žádnou zánětlivou reakci. Nosičství je poměrně časté, nejběžnější je u dětí. Nasofaryngeální nosičství se vyskytuje u 10% populace. Streptokok se nachází v různých lokalizacích například nos, hrdlo, kůže, konečník a další. Zdroj infekce může kontaminovat také potraviny. Sekundárním zdrojem nákazy se stává blízké okolí lidí, které vylučují streptokoky, například prachové částice, vzduch, prádlo. Na těchto předmětech mohou streptokoky v zaschlém stavu přežít i několik měsíců. (3,9,17,18,25)

Vnímavost k nákaze je všeobecná a zvýšená zejména u dětí. Závisí také na momentálním stavu nemocného. Po prodělané infekci dochází k imunologické reakci proti jednotlivým sérologickým typům streptokoků, jedná se pak o antibakteriální imunitu, a také proti toxinům, antitoxinová imunita. Antibakteriální imunita je typově specifická, a proto se nákazy mohou opakovat. (3,9,17,18,25)

Inkubační doba je krátkodobá, většinou 1-3 dny s velkým rozpětím 12 hodin až 1 týdne. U revmatické horečky je to 7-35 dní a u akutní glomerulonefritidy 10-21 dní. Období nakažlivosti může být u nosičů, u neléčených infekcí, kožních infekcí a infekcí měkkých tkání několik týdnů až měsíců. (9,18,25)

Způsob přenosu je převážně vzdušnou cestou infekčními sekrety z nosu a krku, kontaktem s nemocným nebo nosičem, nebo kontaminovanou potravou. Nepřímý přenos je umožněn kontaminovanými předměty jako hračky, nádobí a podobně. (3,9,18,25)

K prevenci slouží vyloučení potenciálních nemocných nebo nosičů z epidemiologicky závažných činností, kam patří práce ve zdravotnictví a potravinářství. Mezi represivní opatření se řadí povinné hlášení spály, erysipelu a puerperální sepse. Při výskytu spály se nemocný hospitalizuje. Pokud se vyskytuje v dětských kolektivech, provádí se zvýšený zdravotnický dozor po dobu 8 dnů. U exponovaných dětí se jako profylaxe doporučuje podávat penicilin. (9,18,25)

1.1.7 Terapie

K terapii se používají především beta-laktamová antibiotika. Makrolidy se podávají, pokud se u pacienta vyskytne alergie na beta-laktamy. Další možností u tonzilitid je, že penicilin rozložily na mandlích přítomné mikroorganismy, které produkují enzymy tzv. beta-laktamázy. Těmito mikroby mohou být například *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, nebo *Staphylococcus aureus*. U těžkých infekcí může dojít k tomu, že množství streptokoků vystoupí na takovou hladinu, při které se přestanou množit a tvořit penicilin vázající proteiny. Ty se označují zkratkou PBP (z angličtiny penicillin-binding proteins). Streptokok ze skupiny A je ve 100% citlivý k penicilinu. Nepříznivě se však zvyšuje rezistence k erythromycinu v řadě oblastí ČR. Rezistence *Streptococcus pyogenes* k makrolidům u nás vzrostla až na 17%. Linkosamidy se prokázaly být užiteční v eradikaci faryngeálního nosičství. (12,14,24,30,31)

a) Beta-laktamová antibiotika

Všechny beta-laktamy mají společný tzv. beta-laktamový kruh, který se skládá ze tří atomů uhlíku a jednoho atomu dusíku. Liší se strukturou dalšího připojeného cyklu. Beta-laktamová antibiotika mají schopnost navázat se na enzymy účastnící se tvorby peptidoglykanu. Nazývají se penicilin vázající proteiny. Tím, že se beta-laktamy naváží na PBP, se zastaví tvorba peptidoglykanu a naopak se podnítlí uvolnění autolytických enzymů, které rozruší již vzniklou bakteriální stěnu. Výsledné působení beta-laktamových antibiotik je tedy baktericidní. Jejich účinkem totiž dochází k rozpadu bakteriální buňky. (24,29,30)

Rezistence beta-laktamových antibiotik je dána především tvorbou beta-laktamázy mající schopnost štěpit beta-laktamový kruh. Tak dochází k inhibici těchto antibiotik. Podle substrátového zaměření se beta-laktamázy dělí na penicilinázy, cefalosporinázy a širokospektré enzymy působící jak na peniciliny, tak na cefalosporiny. Beta-laktamázy lze také třídit podle toho, jak dochází k jejich produkci, na konstitutivní a indukibilní, nebo podle genetického zakódování na chromozomální a plazmidové. Konstitutivní beta-laktamázy se vytvářejí nezávisle na přítomnosti beta-laktamového antibiotika, indukibilní naopak vznikají po jejich stimulaci. Geny chromozomálních beta-laktamázy se nacházejí přímo na chromozomech bakterií a jsou předávány dělením buněk stejnému kmeni. Geny plazmidových beta-laktamázy se vyskytují na plazmidech a mají schopnost se šířit na bakterie jiných kmenů, ale i na jiné druhy. (24,29)

Mezi beta-laktamová antibiotika patří peniciliny, cefalospiriny, monobaktamy a karbapenemy. Protože se k terapii streptokokových nákaz předepisují především peniciliny, budu se jim věnovat podrobněji. Penicilinová antibiotika se rozdělují do čtyř skupin, a to na základní, širokospektré peniciliny, peniciliny stabilní vůči stafylokokové penicilináze a stabilní vůči penicilinázám gramnegativních bakterií. Lékem volby u streptokokových infekcí je stále penicilin, který se používá i k profylaxi opakujících se útoků revmatické horečky. Včasná léčba penicilinem může zabránit vzniku imunitní reakce proti streptokokům, především zamezí vzniku pozdních následků. (24,30,31)

Do skupiny základních penicilinových antibiotik se řadí benzylpenicilin a phenoxymethylpenicilin. Benzylpenicilin (penicilin G) zahrnuje ve svém spektru účinku grampozitivní koky a tyčky, gramnegativní koky a gramnegativní bakterie spirálovitého tvaru. Výjimku tvoří kolonie grampozitivních koků, které tvoří penicilinázu. Indikací jsou především streptokokové infekce, ale i infekce vyvolané viridujícími streptokoky, pneumokoky, meningokoky atd. Existují varianty benzylpenicilinu jako jeho draselná sůl (krystalický penicilin), špatně rozpustná sůl prokain-benzylpenicilin a ještě méně rozpustná sůl benzathin-benzylpenicilin. Krystalický penicilin se podává intravenózně u závažných streptokokových infekcí, pneumokokových pneumonií, gonokokové sepse a dalších. Prokain-benzylpenicilin je určen jen k nitrosvalové aplikaci při infekcích, u kterých není nutné vytvářet vyšší koncentrace penicilinu v organismu. Benzylpenicilin se ze svalů postupně během 24 hodin uvolňuje. Proto se používá k léčbě infekcí vyvolaných *Streptococcus pyogenes*, kmeny pneumokoků, které jsou dobře citlivé, ale také k léčbě infekcí způsobených *Treponema pallidum*. Benzathin-benzylpenicilin je depotní preparát podávající se jednorázově intramuskulárně. Benzylpenicilin se pak uvolňuje z místa podání asi po dva týdny. Používá se k profylaxi revmatické horečky a k jednorázové terapii streptokokové tonzilitidy nebo faryngitidy. (10,24,29,30)

Biosyntetický penicilin určený k perorálnímu podávání se nazývá phenoxymethylpenicilin (penicilin V). Je to nejčastěji předepisované a účinné antibiotikum, které odolává účinku žaludeční šťávy, proto se podává perorálně. Má stejné spektrum účinku jako benzylpenicilin. Penicilin V vykazuje oboustranně zkříženou rezistenci s benzylpenicilinem. Phenoxymethylpenicilin je lékem volby u streptokokových infekcí, akutní ulcerózní stomatitidy a dalších onemocnění. (10,22,24,30)

Širokospektré peniciliny obsahují ve své skupině aminopeniciliny, karboxypeniciliny, acylureidopeniciliny a amidinopeniciliny. Pro streptokokové infekce jsou důležité aminopeniciliny. Ty působí na širší spektrum mikrobů než výše popsané peniciliny, avšak citlivost grampozitivních koků k aminopenicilinům je ve srovnání s benzylpenicilinem menší. Mezi nejdůležitější zástupce aminopenicilinů patří ampicilin a amoxicilin. Ampicilin se po perorálním podání vstřebává hůře než amoxicilin, proto

se již na trhu v perorální formě nevyskytuje. Podává se při infekcích způsobených pneumokoky rezistentními na penicilin a při infekcích vyvolaných kmenem *Streptococcus agalactiae*, dále u salmonelóz, shigelóz a u dalších infekcí. Amoxicilin je polysyntetický strukturální analog ampicilinu. Spektrum účinku má jako ampicilin s tou výjimkou, že je prakticky neúčinný na shigely. Amoxicilin se podává pouze perorálně a vstřebává se v proximální části zažívacího traktu. Indikuje se při infekcích horních i dolních cest dýchacích, u akutních sinusitid, při zánětech středního ucha a také při salmonelózách a infekcích močových cest. (11,24,29,30)

Ze skupiny penicilinů odolných vůči účinkům stafylokokové penicilinázy se u nás používá jen oxacilin. Ten působí na stejné mikroorganismy jako benzylpenicilin s tím rozdílem, že oxacilin má asi desetkrát menší účinnost. Nitrožilně se podává u těžkých stafylokokových infekcí, které vyvolávají kmeny produkující penicilinázu. Zejména se jedná o stafylokokovou sepsi, akutní endokarditidu a pneumonii. K orální aplikaci se využívá při stafylokokových infekcích měkkých tkání. (11,24,29,30)

b) Makrolidy

Makrolidy jsou makrocyclické laktony, které mají ve své struktuře 14-16členný kruh, na který jsou většinou navázány dva méně obvyklé cukry. Mezi makrolidy patří poměrně homogenní skupina antibiotik mající podobnou strukturu, podobné spektrum účinku a antimikrobiální vlastnosti a účinky. Liší se pouze svou farmakokinetikou. Účinek makrolidů spočívá ve vazbě na ribozomální RNA a inhibici proteosyntézy. Po vytvoření peptidové vazby totiž nemůže dojít k uvolnění tRNA. Makrolidy tedy působí bakteriostaticky. (24,29,30)

Erythromycin má spektrum účinku jako penicilin, zasahuje převážně grampozitivní koky, gramnegativní bakterie a spirochety. Erythromycin je alternativní léčbou streptokokových infekcí, prevence revmatické horečky a pneumokokových infekcí dýchacích cest. Podává se u pacientů, kteří mají alergii na penicilin. U streptokoků, stafylokoků a hemofilů se musí počítat s vysokým procentem rezistentních kmenů. Podává se perorálně. Lépe proniká do buněk, kde nabývá vyšších hladin než

v plazmě, proto může ničit i intracelulárně uložené patogeny. K exkreci dochází žlučí. Často se po jeho požití projevuje nevolnost i zvracení. Po delším podávání vysokých dávek účinkuje hepatotoxicky a ototoxicky. Rezistence k erythromycinu je způsobena methylováním adeninového zbytku v molekule RNA, tím se znemožní vazba antibiotika. U části streptokoků je rezistence také vyvolána aktivním vyčerpáváním z buňky. S ostatními makrolidy má úplnou zkříženou rezistenci a s linkosamidy částečnou. (12,24,29,30)

Klarithromycin má podobné spektrum účinku jako erythromycin. Působí však dvakrát účinněji na *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus pneumoniae* a až osmkrát účinněji na *Chlamydia trachomatis* než erythromycin. Klarithromycin má s erythromycinem úplně zkříženou rezistenci. Podává se jako alternativa penicilinu, například při přecitlivělosti na něj. Léčí se jím streptokoková tonzilitida, faryngitida a nekomplikované infekce měkkých tkání, ale i prevence revmatické horečky. (13,24,29,30)

Roxithromycin působí na tytéž mikroby jako erythromycin, ale má vyšší účinek například na legionely a chlamydie. Pokud jsou kmeny rezistentní k erythromycinu, jsou také rezistentní k roxithromycinu. Používá se jako alternativa penicilinu. Dobře účinkuje na atypické pneumonie. (12,24,30)

Spiramycin se také používá jako alternativa pro léčbu streptokokových tonzilitid a faryngitid, ale i k prevenci revmatické horečky. Na *Toxoplasma gondii* je dobře účinný. Využívá se jako náhrada za penicilin. Spiramycin má schopnost snížit adhezi stafylokoků a streptokoků na buňky dutiny ústní. Považuje se za jedno z nejméně toxických antibiotik. Koncentruje se uvnitř buněk a postupně se z nich uvolňuje. Kmeny, které jsou rezistentní k erythromycinu, jsou většinou také rezistentní ke spiramycinu. (13,23,24,30)

c) Linkosamidy

Z linkosamidů se dnes používají jen clindamycin a linkomycin. Oba mají stejné spektrum účinku. To je úzké a podobné spektru erythromycinu. Do tohoto spektra se

řadí aerobní grampozitivní koky, jako streptokoky, stafylokoky a pneumokoky. Dále sem patří aerobní tyčky (např. *Corynebacterium diphtheriae*). Linkosamidy mají bakteriostatický účinek, protože zasahují do tvorby bílkovin tím, že se naváží na ribozomy. Následně dojde k inhibici peptidyltransferázy a zabránění vzniku peptidové vazby. V dnešní době se více používá clindamycin pro vyšší antibakteriální účinnost a výhodnější farmakokinetiku. (24,29,30)

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem této práce je osvojení si praktických znalostí správné laboratorní praxe při zpracování výtěrů z horních cest dýchacích a ucha při podezření na výskyt bakterie *Streptococcus pyogenes*. Totéž platí i pro jeho diagnostiku. Dále si ověřím citlivost na beta-laktamová antibiotika a makrolidy u izolovaných kmenů *Streptococcus pyogenes*. Zjistím četnost výskytu pyogenního streptokoka při diagnóze faryngitidy a otitidy u dětí. Získané výsledky následně zpracuji statisticky. Protože mě zajímalo, jak lékaři pro děti a dorost postupují při podezření na infekci horních cest dýchacích způsobenou *Streptococcus pyogenes*, rozhodla jsem se tyto informace zjistit pomocí dotazníku.

Cíle by se tedy daly shrnout do několika bodů:

1. shrnutí obecných znalostí týkajících se bakterie *Streptococcus pyogenes* k následnému využití při kultivaci a identifikaci v laboratoři
2. osvojení si kultivačních a identifikačních metod v rámci laboratorní praxe
3. určení citlivosti získaných kmenů na beta-laktamy a makrolidy
4. zjištění četnosti výskytu kmene *Streptococcus pyogenes* izolovaného z výtěru z krku a ucha a ověření s četností výskytu udávanou v odborné literatuře
5. statistické zpracování získaných výsledků
6. zjištění, jak postupují dětské lékaři při podezření na streptokokovou infekci horních cest dýchacích

2.2 Hypotézy

Hypotéza 1:

Výskyt *Streptococcus pyogenes* při diagnostice faryngitidy a otitidy bude vyšší v zimě.

Hypotéza 2:

Rezistence k makrolidům má z důvodu vyšší spotřeby antibiotik ve společnosti stoupající charakter.

Hypotéza 3:

Četnost výskytu kmene *Streptococcus pyogenes* zachyceného v odebraném materiálu bude nižší, a to z důvodu provedení odběrů v ordinaci dětských praktických lékařů až po neúspěšné antibiotické terapii bez předchozího kultivačního vyšetření.

3. Metodika

3.1. Charakteristika souboru

Data pro svou bakalářskou práci jsem sbírala v laboratoři Laboma mikrobiologická laboratoř s.r.o. (laboratoř „Laboma“), která sídlí v Českých Budějovicích. Materiál zaslaný k bakteriologickému kultivačnímu vyšetření pochází z terénních ordinací od praktických lékařů i lékařů odborných specialistů z jižních Čech.

Sběr dat jsem prováděla za období od 1. ledna 2008 do 31. prosince 2008. Tato práce se týká především dětské populace, proto jsem se po dohodě se svojí školitelkou rozhodla, že se budu soustředit na děti ve věku do 12 let. Výběr jsem zúžila i s ohledem na uvedené diagnózy. Do souboru jsem vybírala pouze výtěry s následujícími čísly diagnóz: J03.9 (akutní tonzilitida NS), J35.9 (chronická nemoc mandlí a aden. tkání NS), J00. (akutní zánět nosohltanu), J02.0 (streptokokový zánět hltanu), J02.9 (akutní zánět hltanu NS), J03.0 (streptokoková tonzilitida), J03.8 (akutní tonzilitida způsobená jinými urč. org.), J06.0 (akutní zánět hltanu i hrtanu), J02.8 (akutní zánět hltanu způsob. jinými urč. org.), J04.0 (akutní zánět hrtanu), A38. (spála), J35.1 (hypertrofie mandlí), J35.0 (chronický zánět mandlí), J31.1 (chronický zánět nosohltanu), H66.0 (akutní hnisavý zánět středního ucha), H65.0 (akutní serózní zánět středního ucha), H66.9 (zánět středního ucha NS), H65. (nehnisavý zánět středního ucha) a H92.0 (bolest v uchu - otalgia). Výsledky vyšetření se vztahují ke vzorkům, které byly transportovány do laboratoře za uvedené časové období.

Postup lékařů pro děti a dorost jsem zjišťovala pomocí dotazníku, který najdete v příloze. Výběr lékařů jsem zúžila na ty, kteří zasílají materiál do mikrobiologické laboratoře „Laboma“.

Metody použité k vyšetření materiálu jsou popsány níže.

3.2 Odběr a transport vzorků do mikrobiologické laboratoře

3.2.1 Odběr materiálu

Odběr materiálu na vyšetření při podezření na přítomnost bakterie *Streptococcus pyogenes* při respiračních infekcích se provádí výtěrem zanícených ložisek. Nejčastěji se vyšetřuje výtěr z krku, ale je možné vyšetřit i stěr z nosohltanu a hltanu. Při otitidě se materiál odebírá při paracentéze jehlou a injekční stříkačkou. Pokud nelze tento způsob provést, je potřeba použít výtěrovku s transportní půdou. (27,33)

K obecným zásadám odběru patří, že stěr je odebrán před započítím antibiotické léčby. Postup musí být proveden lege artis a asepticky. Další podmínkou je jednoznačná identifikace vzorku, na kterém musí být uvedeno jméno a příjmení pacienta, rodné číslo a druh materiálu. Materiál musí být provázen žádankou, na které se kromě již zmiňovaných údajů vyskytují ještě diagnóza, zdravotní pojišťovna, IČZ a adresa žadatele, datum a čas odběru a případná již aplikovaná antibiotická terapie. (27,33)

Výtěrovka může být vyrobena ze dřeva, plastu nebo drátu a je uložena v plastové zkumavce či obalu. Další variantu představuje výtěrovka s polotuhým transportním médiem zlepšující transport většiny citlivých a kultivačně náročných bakterií. Tento způsob je sice dražší, ale z hlediska zachytu bakterií výhodnější. Vatový tampon bez transportní půdy se před použitím musí navlhčit sterilním fyziologickým roztokem. (8,33)

Mikrobiologická laboratoř „Laboma“ poskytuje spolupracujícím lékařům odběrový materiál a používá pouze výtěrky s transportní půdou.

3.2.2 Transport materiálu

Obecně pro transport biologických vzorků do mikrobiologické laboratoře platí, že musí být co nejrychlejší. Zejména u růstově náročných bakterií se při časové prodlevě výrazně snižuje možnost diagnostiky. Nejcitlivější na transport jsou tampony bez transportního média, proto přeprava do laboratoře nesmí nepřesáhnout dvě hodiny.

Doprava výtěrovky s transportní půdou by neměla být delší než 24 hodin při pokojové teplotě. (8,26,33)

Materiál do laboratoře „Laboma“ je svážen v průběhu dopoledních hodin a transport vzorků při běžném provozu nepřesahuje 4 hodiny. Pokud se objeví v zaslaném materiálu výtěrovka bez transportního media, laboratoř následně kontaktuje lékaře a je mu doručena výtěrovka s transportním mediem pro další zaslané odběry.

3.3 Kultivace

Pyogenní streptokok je poměrně náročný na kultivaci. Pro svůj růst vyžaduje obohacené půdy. Jejich základy se připravují z kvalitnějších extraktů jako mozkosrdcová infuze. Obohacují se o bílkovinné koncentráty a hydrolyzáty, o přípravky obsahující vitaminy a případně o speciálními peptony. K těmto obohaceným základům se podle potřeby přidávají další přípravky jako bovinní nebo koňské sérum, hydrolyzovaný bovinní albumin a chemicky definovaná obohacovala obsahující směsi vitaminů a dalších růstových faktorů. Nejčastěji používaným obohacovadlem je krev. Na živném agaru a v živném bujónu roste *Streptococcus pyogenes* velmi špatně. V tekutých půdách roste a usazuje se jako sediment, avšak půda nad ním může být čirá. (30,32)

3.3.1 Kultivační zpracování výtěrů z krku

Nejspolehlivější metodou jak diagnostikovat *Streptococcus pyogenes* je vyočkování výtěru z mandlí a zadní stěny hltanu na krevní agar. Abychom zachytili hemolýzu způsobenou oxygenlabilními hemolyziny, doporučuje se doplnit roztěr o několik šikmých vpichů. Poté se nechá vyočkováná plotna kultivovat při 37°C. Odečítání se provádí v rozpětí 18 až 48 hodin. (18,26,31)

V mikrobiologické laboratoři „Laboma“ se výtěr z krku zpracovává na krevní agar, do jehož naočkovaného inokula se pokládají disky s penicilinem a erythromycinem. Tento způsob zpracování umožňuje odečíst citlivost k uvedeným

diskům ihned po inkubaci. Dále se ještě výtěry očkují na čokoládový agar pro záchyt hemofilů. Sputa se zpracovávají na další kultivační půdy, a to z důvodu širšího záchytu případného patogena. Doplňující je Endova půda a Sabouraudův agar.

Laboratoř „Laboma“ si kultivační půdy nepřipravuje, ale nakupuje je již hotové od certifikovaných výrobců, kteří garantují přípravu půd za standardních podmínek a zajišťují i dodržení transportních podmínek. Manipulace s půdami a jejich skladování je v laboratoři přísně kontrolováno, aby tak nedocházelo nevhodnou manipulací k ovlivnění výsledků kultivačního vyšetření.

Pouze z informativních důvodů proto nyní uvádím údaje o používaných kultivačních půdách.

a) Krevní agar

Krevní agar připravíme přidáním 5-10% sterilní defibrinované ovčí krve k agarovému základu, který je ochlazený na 45-50°C. Hmota se po opatrném promíchání vlije do Petriho misek a nechá se ztuhnout. Takto připravená půda umožňuje sledovat hemolytické vlastnosti narostlých kolonií. Díky nim lze kmeny diagnostikovat, a proto můžeme na tuto půdu nahlížet jako na diagnostickou. Někteří autoři ji pro svou nenahraditelnost řadí mezi půdy základní. (30,32)

Na krevním agaru roste *Streptococcus pyogenes* v drobných bílých koloniích s průměrem okolo 0,5 mm. Kolonie jsou obklopeny širokou zónou úplné beta-hemolýzy. Tu ovlivňuje pH půdy a také obsah kyslíku. Čím je nižší pH a nižší tenze kyslíku, tím je zóna hemolýzy výraznější. Přítomnost redukujících cukrů ji naopak potlačuje. Kmeny, které mají pouzdro, rostou ve větších mukoidních koloniích. Krevní agar se po naočkování kultivuje v termostatu za zvýšené tenze CO₂ (5%) při 37°C v rozmezí 18-48 hodin. (15,26,31)

b) Čokoládový agar

Protože některé bakterie nedokáží využít živiny z krevního agaru, musíme erythrocyty rozrušit přidáním krve do horkého agaru. K přípravě čokoládového agaru musíme mít větší množství krve než u krevního agaru (7-10%). Krev se smíchá

s agarovým základem a za stálého míchání se zahřívá na teplotu 80-85°C. Půda tak získá neprůhlednou hnědou barvu. Po ochlazení na 45°C se mohou přidávat další obohacovadla. Na čokoládovém agaru dobře rostou hemofily a meningokoky. (30,32)

3.3.2 Kultivační zpracování materiálu z ucha

V mikrobiologické laboratoři „Laboma“ se pro vyšetření materiálu získaného z ucha používají jako u výtěrů z horních cest dýchacích krevní agar, do jehož inokula se pokládají disky s penicilinem a erythromycinem, a čokoládový agar. Dále se používají Sabouraudův agar, Endova půda, modifikovaný krevní agar 1 (MKA1) a živný bujon (thioglikolátový). Pro lepší záchyt kmenů *Streptococcus pyogenes* ve výtěru z ucha se používá i CNA agar s větší citlivostí k uvedenému kmeni bakterie. (32)

a) Sabouraudův agar

Sabouraud slouží k pěstování kvasinek a plísní. Připraví se přidáním glukózy případně maltózy k protonovému základu. (30)

b) Endova půda

Patří mezi selektivně diagnostické půdy pro gramnegativní bakterie. Důvodem jejího zařazení mezi selektivní půdy je schopnost růstu nenáročných gramnegativních bakterií, hlavně enterobakterií. Potlačení grampozitivních bakterií se umožňuje přidáním bazického fuchsinu, který zabrání jejich růstu. Důvod pro zařazení mezi diagnostické půdy jí zajistila schopnost bakterie diagnostikovat je prostřednictvím štěpení laktózy. Jako indikátor se používá bazický fuchsin, ten je však odbarvený siřičitanem sodným. Bazický fuchsin se chová jako Schiffovo reagens. Metabolismem laktózy za přítomnosti siřičitanu se v půdě hromadí její produkt acetaldehyd. Jeho reakcí se Schiffovým reagens dochází k červenému zbarvení, proto mikroorganismy štěpící laktózu rostou na Endu v tmavočervených koloniích. Půda v okolí kolonií se také zbarví do červena. (30)

c) Krevní agar Columbia CNA

CNA agar je selektivní půda pro záchyt stafylokoků a streptokoků. Může se použít i k záchytu anaerobních grampozitivních koků. Má bohatý živný základ ze speciálních peptonů z kaseinu, živočišných tkání a z trypticky natráveného hovězího srdce. Tento základ se obohacuje škrobem, beraní krví a přísadkou antibiotik kolistin a kyseliny nalidixové. Odtud pochází zkratka CNA (colistin, nalidixic acid). Tyto antibiotika působí selektivně, protože zabráňují růstu gramnegativních tyčků, včetně proteů, klebsiell a pseudomonád. (32)

3.4 Diagnostický průkaz *Streptococcus pyogenes*

Izolované kolonie bakterie *Streptococcus pyogenes* jsou v laboratoři „Laboma“ dourčovány pomocí PYR-testu a latexové aglutinace, eventuálně je možné provést bacitracinový test. Pokud výsledky z latexové aglutinace nejsou jednoznačné, použije se k dourčení ještě identifikační systém Api 20 Strep.

Při podezření na pozdní následky streptokokových nákaz se zasílá krev na vyšetření ASLO a ADN. Protože se v mikrobiologické laboratoři „Laboma“ tyto testy neprovádějí nebudu se jim podrobněji věnovat.

3.4.1 PYR-test

Pyogenní streptokok dává pozitivní PYR-test. Jedná se o enzymatický test na průkaz PYRázy. Tento test mají pozitivní všechny běžné druhy enterokoků a 98% kmenů *Streptococcus pyogenes*. Je to citlivá, rychlá a spolehlivá metoda. (26,28,31)

Test jsem prováděla podle doporučeného postupu tak, že jsem několik suspektních kolonií rostoucích na krevním agaru setřela na papírovou zónu diagnostického proužku, který obsahuje chromogenní substrát na průkaz PYRázy. Nechala jsem proužek inkubovat 5 minut a poté nanasla na papírovou zónu asi 5 μ l vyvíjecího činidla. Po jedné až pěti minutách jsem odečítala výsledek. Pokud v místě nanesené kolonie došlo ke vzniku červené barvy, reakce byla pozitivní a jednalo se o

Streptococcus pyogenes. Pokud nedošlo k barevné změně, byla reakce negativní. (26,28,31)

3.4.2 Latexová aglutinace

Izolované kmeny *Streptococcus pyogenes* jsem testem s 3% peroxidem vodíku zařadila mezi katalasanegativní bakterie, protože neprodukoval enzym katalasu, která s peroxidem reaguje. Na Petriho misce totiž nedošlo k žádné reakci, netvořily se bublinky. Katalasanegativní beta-hemolytické kolonie jsem do skupiny A zařadila pomocí latexové aglutinace. (26,31)

Latexová aglutinace je rychlá, senzitivní a specifická metoda pro sérologickou identifikaci streptokoků do skupin A, B, C, D, F a G dle Lancefieldové. Určení do skupiny se provádí pomocí polysacharidu nacházejícího se na povrchu streptokoků. V metodě se používá chemicky vyextrahovaný skupinový polysacharidový antigen získaný pomocí kyseliny dusité. Používá se pak v solubilní formě.

Souprava zahrnuje latexovou suspenzi, extrakční reagentie (ER) 1, 2 a 3 a pozitivní kontrolu. Komplet obsahuje šest latexových suspenzí o množství 3 ml. Každá lahvička obsahuje modrou latexovou částici, která je pokrytá čištěnými králičími protilátkami proti streptokokovým skupinám A, B, C, D, F a G.

V setu dále máme jednu lahvičku se 2 ml pozitivní kontroly složené z polyvalentních antigenů získaných z inaktivovaných streptokoků příslušných skupin.

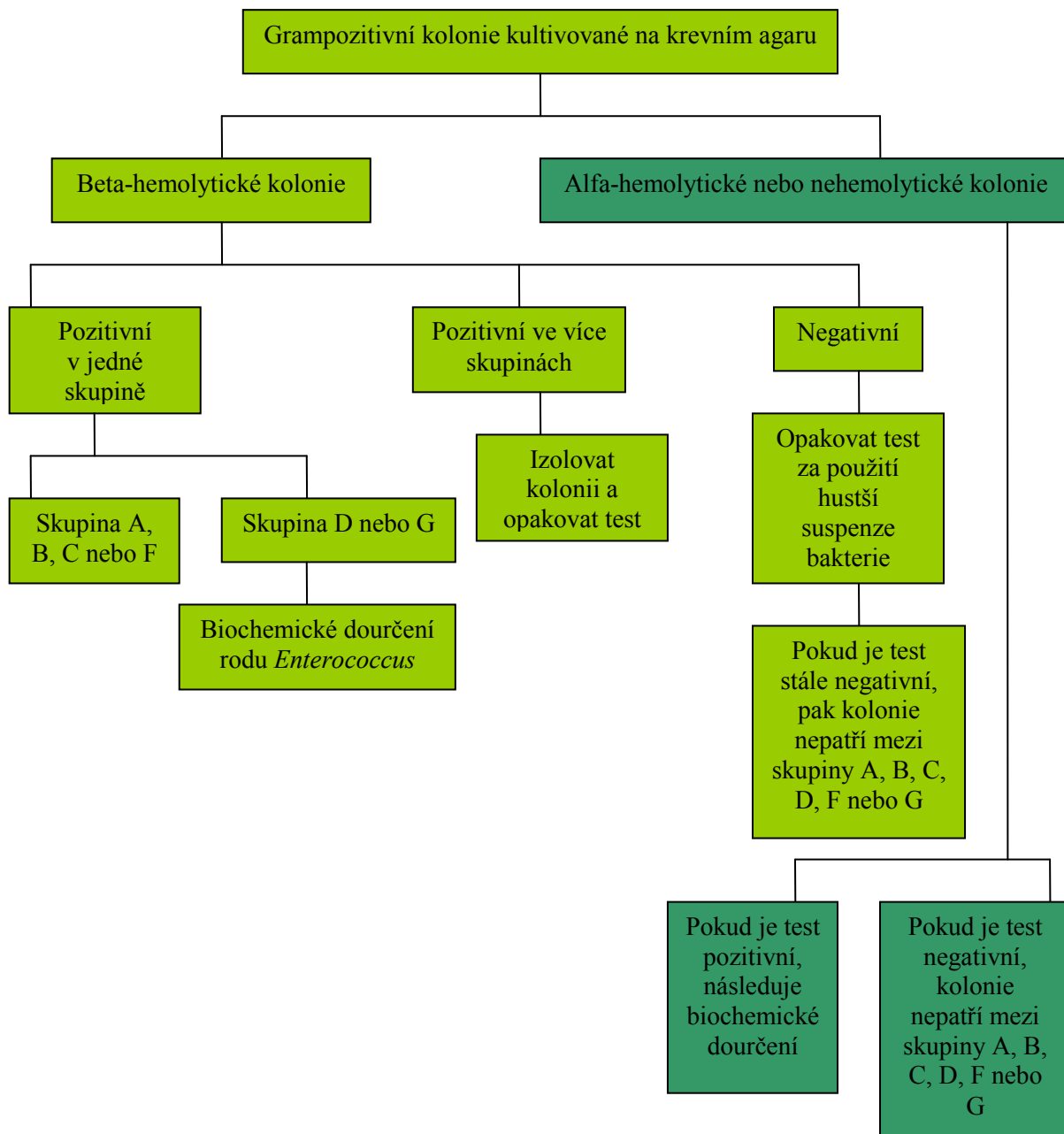
Extrakční reagentie 1, 2 a 3 jsou dodávány v lahvičce s kapátkem. Lahvička s ER 1 a 2 má 3,2 ml, ER 3 pak 8 ml. ER 1 a 2 obsahují chemickou substanci, která je schopná vyextrahovat při pokojové teplotě specifický skupinový antigen. ER 3 se skládá z neutralizačního roztoku, který se určí pomocí modré latexové částice citlivé na čištěné skupinově specifické králičí imunoglobuliny. Tato partikule silně aglutinuje homologní antigeny a nehomologní neaglutinuje.

Do šesti latexových suspenzí, pozitivní kontroly a ER 3 se přidává konzervační přípravek. Kit se musí skladovat při 2-8°C, nesmí zmrznout. Před použitím se musí všechny činidla vytemperovat na pokojovou teplotu, což je 22-28°C.

Postup testu je následující. Do zkumavky, kterou jsem označila číslem vzorku, jsem kápala 1 kapku ER 1. Z krevního agaru jsem bakteriologickou kličkou nabrala 1-4 beta-hemolytické kolonie a přenesla je do zkumavky s ER 1. Pokud byly kolonie drobné, setřela jsem jich větší množství. Zároveň jsem dbala na to, aby nedošlo ke kontaminaci. Poté jsem přidala 1 kapku ER 2 a vzniklou směs protřepávala 5-10 vteřin. Po přidání 5 kapek ER 3 jsem opět protřepala. Na vyznačená místa na testovací kartičce jsem dala jednu kapku z každé modré latexové suspenze a vedle nich přidala Pasteurovou pipetou jednu kapku vytvořené suspenze bakterie. Tyčinkou jsem tyto kapky promíchala a rozetřela po celé kruhové reakční ploše. Následně jsem testovací kartičkou pomalu kývala. Dávala jsem si pozor, aby se mi obsah sousedních kruhových ploch nesmíchal. Do jedné minuty jsem odečetla výsledek. (6)

Pozitivní výsledek jsem hodnotila pomocí pozitivní kontroly. Výsledek mohl být pozitivní pouze v jedné reakční ploše. Za pozitivní se považuje jasná aglutinace, to znamená viditelná tvorba shluků, v jejichž okolí je tekutina projasněná. Při slabé reakci se test opakuje za použití hustější suspenze bakterií. Negativní výsledek se neprojevuje aglutinací. Kmen nepatří mezi beta-hemolytické bakterie ze skupin A, B, C, D, F nebo G. (6,30)

Obr. 1: Schéma latexové aglutinace pro zařazení streptokoků do příslušné skupiny



Zdroj: DAMONDIAL STREP KIT

3.4.3 Bacitracinový test

K předběžné identifikaci je možné použít i bacitracinový test. Do inokula naočkovaného krevního agaru se položí disk s bacitracinem. Plotna se pak nechá

inkubovat při 37°C. Streptokoky ze skupiny A kolem disku s antibiotikem nerostou, ostatní beta-hemolytické streptokoky ho v nízké koncentraci tolerují. (26,31)

3.4.4 Identifikační systém Api 20 Strep

Tato metoda zahrnuje dvacet biochemických testů, které poskytují skupinovou nebo druhovou identifikaci většiny streptokoků, enterokoků a jejich příbuzných mikroorganismů.

Souprava se skládá z dvaceti mikrozkušavek obsahující dehydratované substráty pro zjištění enzymatické aktivity nebo fermentace cukrů. Enzymatické testy se inokulují hustou suspenzí mikroba získaného z čisté kultury. Během inkubace vznikají metabolismem barevné změny. Ty mohou být spontánní nebo se projeví po přidání činidel. Fermentační testy se inokulují obohaceným médiem, který rehydratuje substráty cukrů. Tyto metody se detekují změnou indikátoru pH. Za 21. test se považuje typ hemolýzy (HEM). Beta-hemolýza se považuje za pozitivní s číselnou hodnotou 4. Ostatní typy hemolýzy se hodnotí jako negativní a jejich číselná hodnota je 0. Reakce se odečítají podle odečítací tabulky.

Testovací proužky obsahují jako aktivní složky pyruvát sodný (VP), kyselinu hippurovou (HIP), eskulin citrát železitý (ESC), β -naftylamid pyroglutamové kyseliny (PYRA), 6-brom-2-naftyl- α D-galaktopyranosid (α GAL), naftol ASBI-glukuronovou kyselinu (β GUR), 2-naftyl- β D-galaktopyranosid (β GAL), 2-naftylfosfát (PAL), L-leucin- β -naftylamid (LAP), L-arginin (ADH), D-ribosu (RIB), L-arabinosu (ARA), D-mannitol (MAN), D-sorbitol (SOR), D-laktosu (LAC), D-trehalosu (TRE), inulin (INU), D-raffinosu (RAF), škrob (AMD) a glykogen (GLYG). K soupravě se nedodávají některá činidla, ale jsou potřebná. Patří k nim NIN, VP 1 + VP 2, ZYM A a ZYM B.

Po izolaci suspektní kolonie jsem si vytvořila její hustou suspenzi se zákalem větším než 4 stupně dle McFarlanda. Takto připravenou suspenzi jsem použila ihned po jejím připravení. První polovinu testovacího proužku jsem naplnila touto suspenzí (testy VP až ADH). Při plnění nesmí dojít k tvorbě bublin. 100 μ l suspenze jsem aplikovala

do testu VP až LAP. Pro test ADH jsem naplnila pouze zkumavku. Do ampule s API GP médiem jsem pak přidala zbytek suspenze a dobře promíchala. Tuto novou suspenzi jsem rozplnila do druhé poloviny proužku (testy RIB až GLYG). Jamky s testy ADH a GLYG jsem naplnila minerálním olejem, čímž jsem vytvořila konvexní meniskus. Na misku jsem přiložila víko a nechala ji inkubovat při 36°C za anaerobních podmínek po dobu 4 až 4,5 hodiny. Pokud bylo vyžadováno druhé odečítání, tak se miska inkubovala 24 hodin.

Po čtyřhodinové inkubaci jsem k testu VP přidala jednu kapku z každého činidla VP 1 a VP 2, k testu HIP dvě kapky NIN a k testům PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL a LAP jsem přidala 1 kapku z každého činidla ZYM A a ZYM B. Po deseti minutách jsem odečetla reakce pomocí odečítací tabulky. Pokud bylo nízké rozlišení, nepříjemný nebo pochybný profil, nebo vyskytla-li se poznámka „identifikace neplatná před 24 hodinami inkubace“, byla nutná reinkubace. Vyhodnocení jsem pak prováděla ještě po 24 hodinách u ESC, ADH a od RIB do GLYG. Neodečítají se enzymatické testy (HIP, PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL a LAP) a VP. Do výsledkové tabulky jsem zaznamenala všechny výsledky.

Identifikaci jsem prováděla pomocí číselného profilu. Ten jsem získala tak, že se testy rozdělily do skupin po třech a každému se přiřadila hodnota 1, 2 nebo 4. Sčítáním hodnot, které odpovídaly pozitivním reakcím, vznikl sedmimístný číselný profil. Vyhodnocení se získalo porovnáním s analytickým přehledem profilů nebo pomocí identifikačního softwaru.

Streptococcus pyogenes má pozitivní reakce po 4/24 hodinách u PAL (100%), LAP (100%), ADH (99%), LAC (99%), PYRA (98%), TRE (98%), HEM (98%), AMD (61%), GLYG (22%), β GUR (15%), MAN (8%), ESC (5%), HIP (1%), SOR (1%) a RAF (1%). (1)

3.5 Stanovení citlivosti na antibiotika

Ke správné laboratorní praxi náleží i doplnění nálezu stanovením citlivosti izolovaného kmene na antibiotika. Obecně lze průkaz provádět kvalitativně i

kvantitativně. Nejčastěji se z kvalitativního stanovení provádí diskový difúzní test. U kvantitativního průkazu se zjišťuje minimální inhibiční koncentrace (MIC) určitého antibiotika, která zastaví růst daného mikroba nebo vede k jeho usmrcení.

Pro diskový difúzní test se používá Muellerův-Hintonové agar. Princip této metody spočívá v tom, že pokud je bakterie k danému antibiotiku citlivá, tak v jeho okolí dojde k inhibici růstu a vytvoří se tzv. inhibiční zóna o měřitelné velikosti. Z krevního agaru jsem nabrala kolonie *Streptococcus pyogenes* a přenesla je do fyziologického roztoku s glukózou. Hustota zákalu roztoku byla okolo 0,5 stupně dle McFarlandovy zákalové stupnice. Poté jsem roztok přelila přes Muellerův-Hintonové agar a přebytek odsála. Pomocí speciální raznice jsem na něj pokládala disky s antibiotiky. Výhodou použití raznice je, že se na jedno její stlačení najednou aplikuje požadované množství antibiotických disků, nejvýše však šest, které jsou na agaru rovnoměrně rozmístěny. Takto připravený agar jsem nechala inkubovat při 37°C 18 hodin. Po uplynutí této doby se odečítají výsledky. Provádí se to tak, že se změří průměry inhibičních zón. Za citlivý se považuje kmen, který má stejný nebo větší průměr zóny než referenční kmen stejného druhu. (24,26,30)

V laboratoři „Laboma“ se používá především disková difúzní metoda s touto kombinací antibiotik: penicilin (PNC), ampicilin (AMP), cefazolin (CZL), tetracyklin (TET), erythromycin (ERY) a co-trimoxazol (COT). Tato sestava je určena především k určení citlivosti na antibiotika u kmenů *Streptococcus pyogenes*, který byl izolovaný ze stěrů z ran. U výtěru z krku se již do inokula krevního agaru pokládají disky s penicilinem a erythromycinem. Při snížené citlivosti na erythromycin, což se projeví deformací jinak pravidelné kruhové zóny nebo jejím zmenšením, se test opakuje s disky erythromycinu a clindamycinu k vyloučení rezistence na antibiotika makrolidové skupiny. Ta se potvrdí částečnou deformací kruhové zóny mezi oběma disky.

Pro stanovení MIC je v laboratoři k dispozici test firmy MIDITECH. Metoda se provádí v mikrotitračních destičkách s přesně danými koncentracemi antibiotik. Tento test se ale používá jen ve výjimečných případech, kdy je izolovaný kmen bakterie rezistentní k použité sestavě antibiotik v diskovém difúzním testu.

3.6 Dotazník

Navštívila jsem 20 lékařů pro děti a dorost, kteří byli ochotní vyplnit můj dotazník. V dotazníku jsem se lékařů ptala na tyto otázky:

1. Čekáte na výsledek kultivace a citlivosti kmene na antibiotika při podezření na streptokokové onemocnění horních cest dýchacích?
2. Jaké antibiotikum dáváte pacientům přednostně?
3. Pokud se u pacienta vyskytne alergie na penicilin, jaké antibiotikum nasadíte?
4. Zvete si pacienty na kontrolu po prodělaném streptokokovém onemocnění horních cest dýchacích? Pokud ano, kdy se má pacient na kontrolu dostavit?
5. Provádíte při kontrole pacienta kontrolní výtěr z krku?

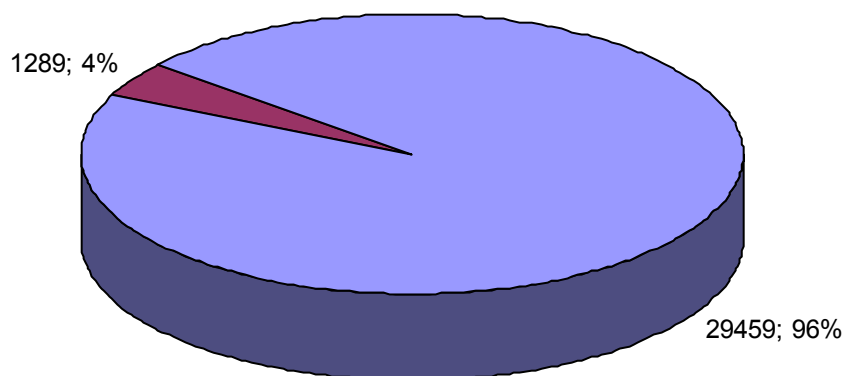
4. Výsledky

4.1 Výskyt bakterie *Streptococcus pyogenes* za rok 2008 a její citlivost na beta-laktamová antibiotika a makrolidy

4.1.1 Výskyt *Streptococcus pyogenes* v horních cestách dýchacích a jeho citlivost

Za rok 2008 se v laboratoři Laboma mikrobiologická laboratoř s.r.o vyšetřilo celkem 29 459 výtěrů z krku. V souboru, který jsem sledovala, se *Streptococcus pyogenes* vyskytl u 1 289 dětí. Z toho bylo 692 chlapců a 600 dívek. Z výsledků šetření, které jsem provedla, vyplývá, že pyogenní streptokok ze 4,4% způsobil onemocnění horních cest dýchacích u dětí.

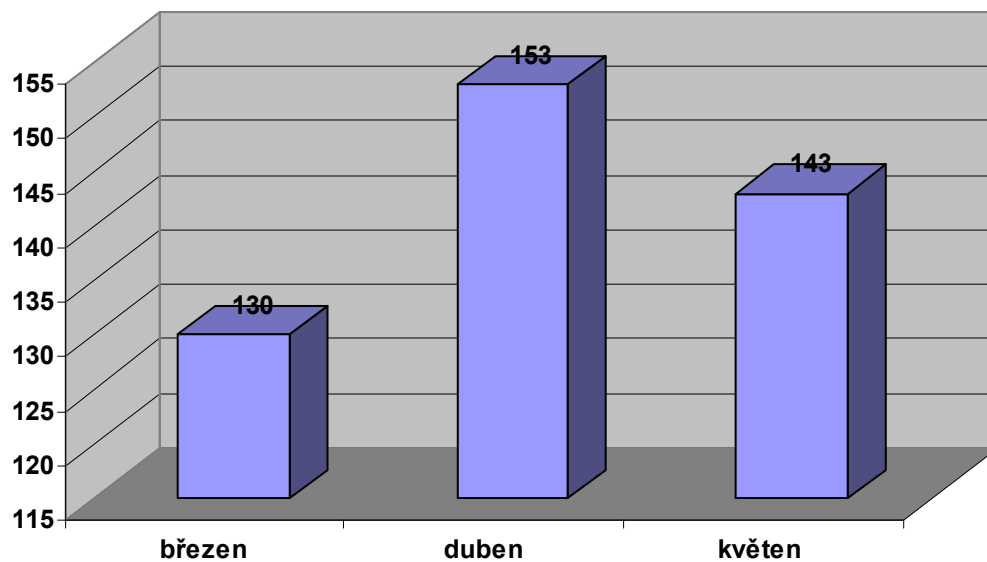
Graf 1: Celkový výskyt *Streptococcus pyogenes* z horních cest dýchacích u dětí



Zdroj: Vlastní šetření

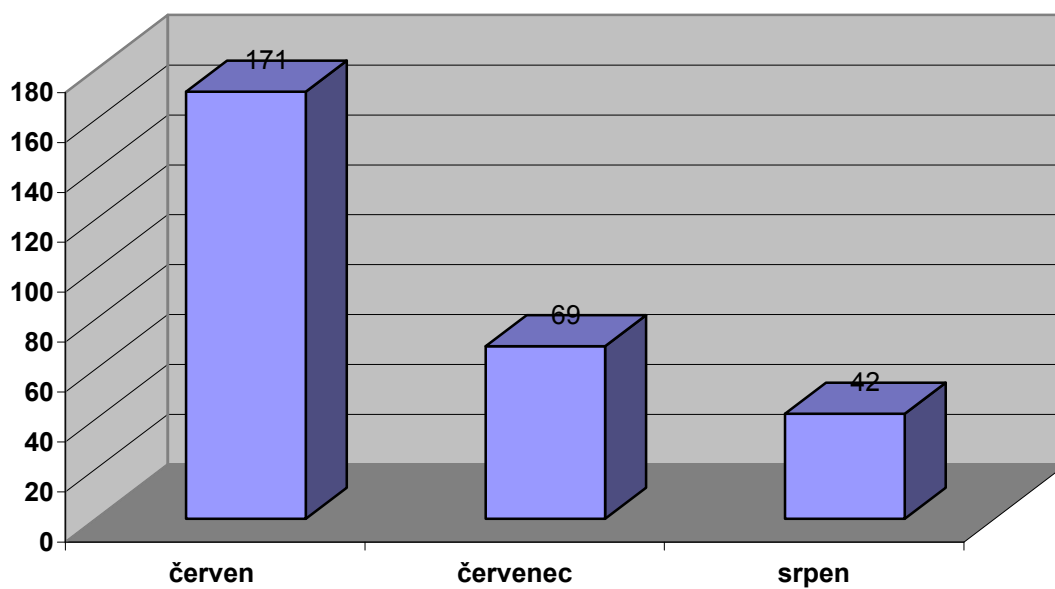
Sezónní výskyt kmene *Streptococcus pyogenes* byl na jaře 426 případů, v létě 282, na podzim 259 a v zimě 322 případů.

Graf 2: Výskyt *Streptococcus pyogenes* na jaře



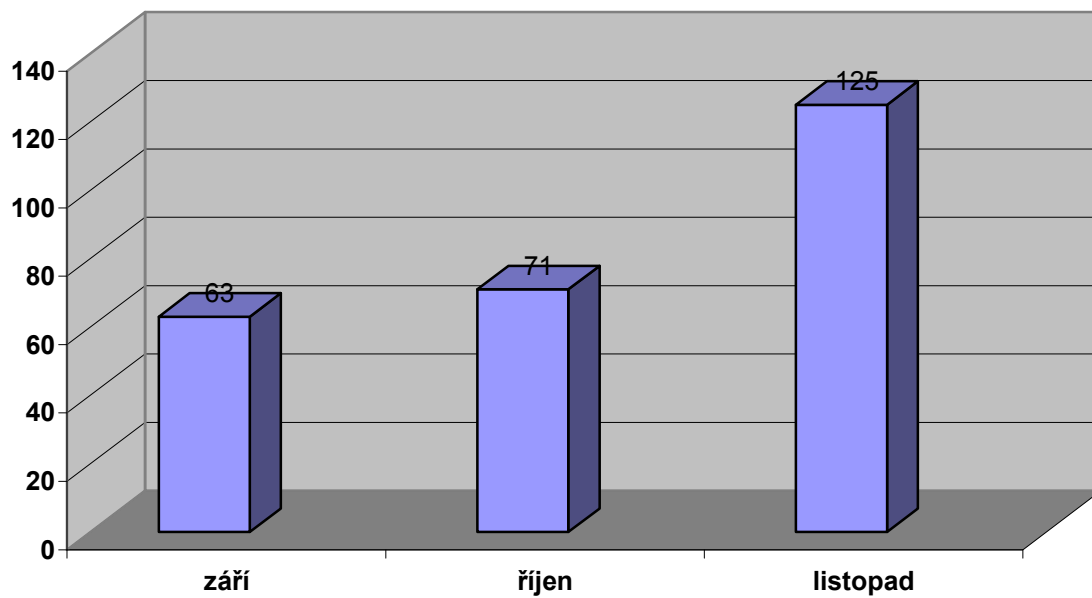
Zdroj: Vlastní šetření

Graf 3: Výskyt *Streptococcus pyogenes* v létě



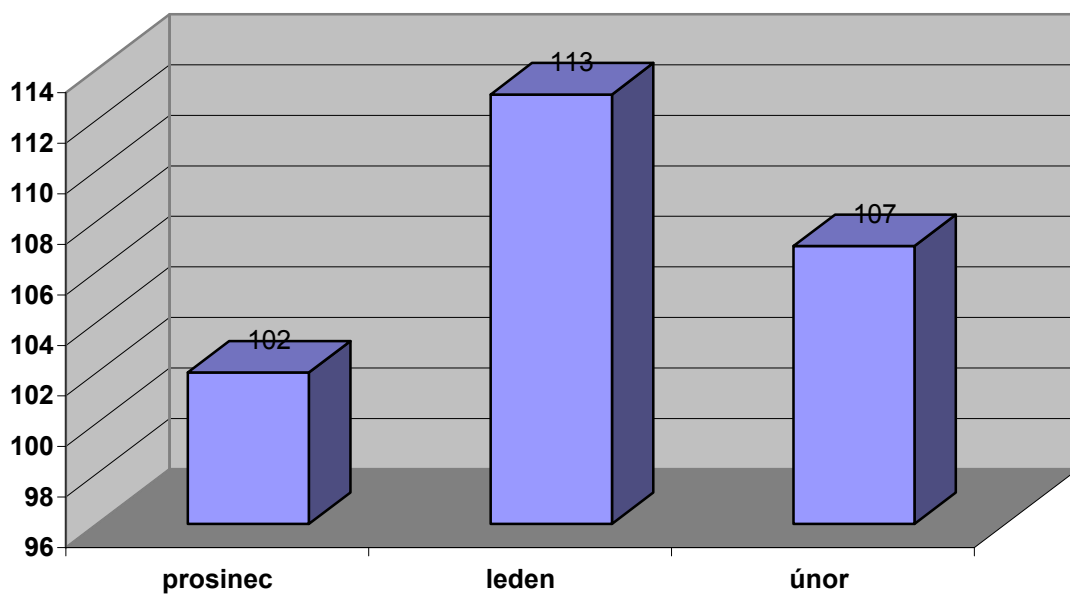
Zdroj: Vlastní šetření

Graf 4: Výskyt *Streptococcus pyogenes* na podzim



Zdroj: Vlastní šetření

Graf 5: Výskyt *Streptococcus pyogenes* v zimě



Zdroj: Vlastní šetření

Tabulka 1: Výskyt *Streptococcus pyogenes* podle věku dítěte

věk	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Výskyt	82	98	119	155	145	199	167	158	101	43	12	10
Četnost (v %)	6,4	7,6	9,2	12	11,3	15,4	13	12,3	7,8	3,3	0,9	0,8

Zdroj: Vlastní šetření

Z této tabulky vyplývá, že největší nemocnost podle materiálu zasláného do mikrobiologické laboratoře „Laboma“, byla u dětí ve věku sedmi let.

Na žádost lékařů byla některá kultivační vyšetření provedena bez následného stanovení citlivosti na antibiotika. Takových případů se za rok 2008 vyskytlo 14. Stanovení citlivosti na antibiotika se tedy provedlo u 1 275 vzorků. Podle mého šetření byly všechny izolované kmeny bakterie *Streptococcus pyogenes* citlivé k penicilinu. Zjistila jsem také, že se rezistence k erythromycinu vyskytla u 107 případů, takže citlivost k erythromycinu byla 91,6%.

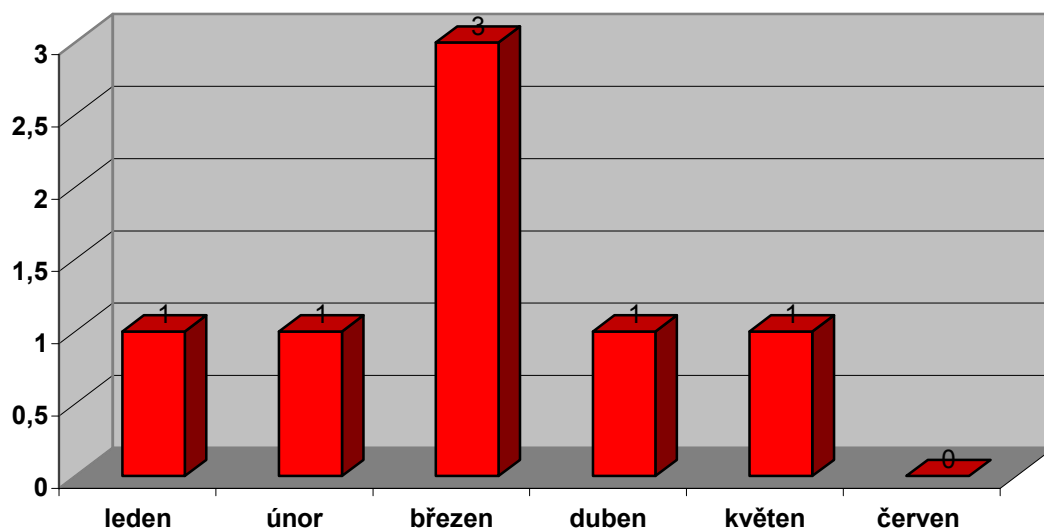
Zkřížená rezistence mezi erythromycinem a clindamycinem se vyskytla u 57 případů, což představuje 4,5%.

Ve výtěru z krku se nacházely i další bakterie jako *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* a kvasinky. Nejčastějším producentem beta-laktamázy byly *Haemophilus parainfluenzae* a *Haemophilus influenzae*. Tvorbu beta-laktamázy jsem zjistila u 338 případů.

4.1.2 Výskyt *Streptococcus pyogenes* v uších a jeho citlivost

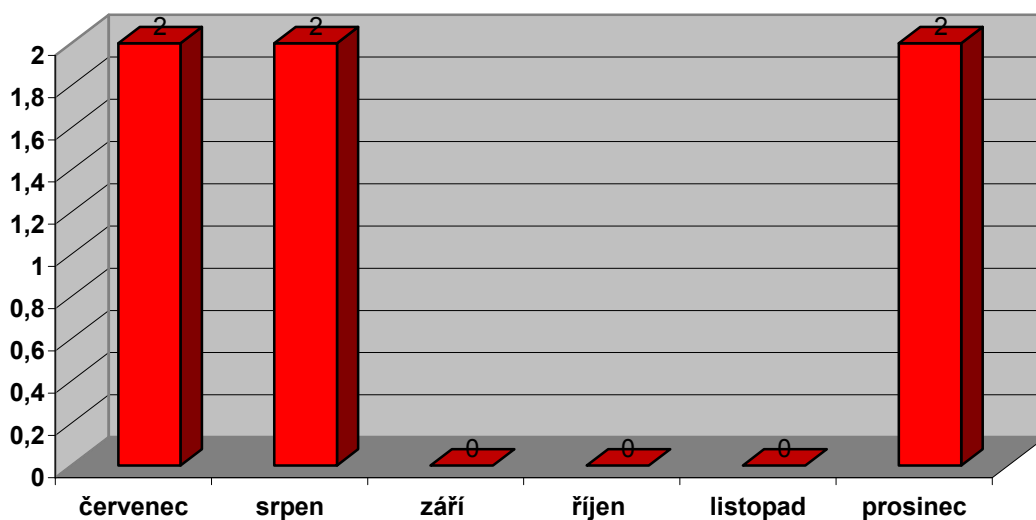
V laboratoři „Laboma“ se vyšetřilo 483 výtěrů z uší. Z tohoto počtu se *Streptococcus pyogenes* prokázal u 13 dětí, což odpovídá 2,7%. Jednalo se o osm dívek a pět chlapců. Pyogenní streptokok se na jaře prokázal v 5, v létě ve 4 a v zimě také ve 4 případech. Na podzim nebyl u dětí *Streptococcus pyogenes* prokázán.

Graf 6: Výskyt *Streptococcus pyogenes* z uší za první pololetí



Zdroj: Vlastní šetření

Graf 7: Výskyt *Streptococcus pyogenes* z uší za druhé pololetí



Zdroj: Vlastní šetření

Kmeny izolované ze sliznice uší byly citlivé na penicilin ze 100%. Na erythromycin byl jeden kmen rezistentní. Citlivost tedy byla 92,3%. Ve dvou výtěrech se nacházel také *Haemophilus influenzae*, který produkoval beta-laktamázu.

4.2 Výsledky získané dotazníkem

Otázka č. 1

Čekáte na výsledek kultivace a citlivosti kmene na antibiotika při podezření na streptokokové onemocnění horních cest dýchacích?

Tabulka 2: Odpovědi na otázku č. 1

uvedené odpovědi	počet odpovědí	počet odpovědí v %
ano	0	0
záleží na klinickém stavu pacienta, pokud je vážný nečekáme	20	100
ne	0	0

Zdroj: Vlastní šetření

Otázka č. 2

Jaké antibiotikum dáváte pacientům přednostně?

Tabulka 3: Odpovědi na otázku č. 2

uvedené odpovědi	počet odpovědí	počet odpovědí v %
penicilin, pokud na něj pacient nemá alergii	20	100
zástupce ze skupiny makrolidových antibiotik	0	0
jiné	0	0

Zdroj: Vlastní šetření

Otázka č. 3

Pokud se u pacienta vyskytne alergie na penicilin, jaké antibiotikum nasadíte?

Tabulka 4: Odpovědi na otázku č. 3

uvedené odpovědi	počet odpovědí	počet odpovědí v %
zástupce ze skupiny makrolidových antibiotik	15	75
zástupce ze skupiny linkosamidů	5	25
jiné	0	0

Zdroj: Vlastní šetření

Otázka č. 4

Zvete si pacienty na kontrolu po prodělaném streptokokovém onemocnění horních cest dýchacích?

Tabulka 5: Odpovědi na otázku č. 4

uvedené odpovědi	počet odpovědí	počet odpovědí v %
ano	14	70
podle stavu pacienta	6	30
ne	0	0

Zdroj: Vlastní šetření

pokud ano, kdy se má pacient na kontrolu dostavit?

14 lékařů odpovědělo: po dobrání antibiotik

Otázka č. 5

Provádíte při kontrole pacienta kontrolní výtěr z krku?

Tabulka 6: Odpovědi na otázku č. 5

uvedené odpovědi	počet odpovědí	počet odpovědí v %
ano	3	15
u opakovaných infekcí ano	11	55
ne	6	30

Zdroj: Vlastní šetření

Z dotazníku jsem zjistila, že pokud není stav pacienta vážný, všichni lékaři čekají na výsledek kultivace a citlivosti. Přesto z dat získaných v mikrobiologické laboratoři „Laboma“ tři lékaři zasílají materiál ke zpracování až poté, co nasazená léčba u pacienta selhala. Všichni dotázaní lékaři přednostně předepisují na streptokoková onemocnění horních cest dýchacích penicilin. Pokud na něj má pacient alergii, pak podávají makrolidy, nebo linkosamidy. Většina lékařů si své pacienty zve na kontrolu po dobrání předepsaných antibiotik pro ověření si jejich zdravotního stavu. Kontrolní výtěry pak lékaři nejčastěji provádějí u opakovaných infekcí.

5. Diskuze

5.1 Hypotéza 1

Hypotézu 1 se mi nepodařilo potvrdit. Podle mých šetření byl sezónní výskyt vyšší na jaře. Vysvětlení můžeme vidět v oslabení organismu po zimě například virovou infekcí. Virová agens způsobující respirační onemocnění mohou působit imunopresivně. Navíc během virové nákazy dochází k destrukci epitelu horních cest dýchacích. Na toto poškození pak snáze nasedají bakterie. (31) Navíc šíření onemocnění v tak úzkém kolektivu, jakým je školka nebo školní třída, je velmi rychlé. Vyšší záchyt může být na jaře ovlivněn i postupně se zlepšujícím počasím.

5.2 Hypotéza 2

Zjistila jsem, že v laboratoři Laboma mikrobiologická laboratoř s.r.o. byla rezistence k makrolidům (erythromycinu) 8,4%. Podle údajů získaných z přehledu (21), kdy v roce 2001 byla rezistence k makrolidům u tonzilitid vysoká (18,1%), dochází postupně k jejímu poklesu. V roce 2008 to již bylo 7,2% (21). Z mé práce také vyplývá, že trend rezistence k makrolidům začíná být sestupný. Jedním z důvodů může být medializace tohoto problému. Většina lékařů si poté uvědomila důsledky empirického podávání antibiotik a začala se více držet doporučených postupů v předepisování antibiotik.

Ke srovnání citlivosti k makrolidům u kmenů izolovaných ze sliznice uší jsem neměla dostatečně velký soubor materiálu zaslaného do laboratoře. Ze 13 vzorků byl pouze jeden kmen *Streptococcus pyogenes* rezistentní k erythromycinu. V přehledu (21) se rezistence snížila z 12,5% na 3,7%.

Podle zjištěných informací jsem dospěla k názoru, že by se i nadále měly dodržovat postupy, které vedou k postupnému snižování rezistence kmenů k makrolidům, a jejich citlivost se tak nadále zvyšovala.

Protože postupně dochází k poklesu rezistence kmenů *Streptococcus pyogenes* k makrolidům, domnívám se, že jsem hypotézu 2 nepotvrdila.

5.3 Hypotéza 3

Pomocí získaných výsledky se mi podařilo potvrdit hypotézu 3. V roce 2008 byl záchyt kmenů *Streptococcus pyogenes* u dětí v laboratoři Laboma mikrobiologická laboratoř s.r.o. z nosohltanu 4,4% a z ucha 2,7%. Oproti údajům získaných z literatury se jsou moje data nižší. Např. v článku (34) uvádí doc. MUDr. Marešová, CSc., že tonzilofaryngitidu způsobuje *Streptococcus pyogenes* z 20% a otitidu asi z 10-20% nebo v přehledech (20,21), který napsala MUDr. Tomášková, byl výskyt pyogenního streptokoka v mikrobiologické laboratoři Lékařské laboratoře s.r.o. 9,7% v horních cestách dýchacích a asi 17% v uchu. Tento rozdíl si vysvětluji tím, že můj soubor nebyl tak rozsáhlý a především zahrnoval pouze děti. Další důvod mi poskytli lékaři. Někteří z nich totiž zasílají materiál na kultivaci a následnou citlivost kmene teprve tehdy, pokud léčba nasazená pacientovi empiricky nezabere. Pokud se *Streptococcus pyogenes* v horních cestách dýchacích nacházel ještě před započítím léčby, nebylo možné ho v materiálu odebraném až po nasazení antibiotické terapie prokázat.

6. Závěr

Mezi nejčastější bakteriální původce onemocnění horních cest dýchacích patří *Streptococcus pyogenes*. Pro správnou a účelnou léčbu těchto nákaz je důležité nejprve identifikovat jejich původce a určit citlivost kmene na antibiotika. V tomto případě se jedná o penicilin a erythromycin. Stoupající rezistence kmenů *Streptococcus pyogenes* na makrolidy ukázala, že nedodržování zásad racionální antibiotické politiky ze strany lékařů, vede k těmto nepříznivým výsledkům. Osvěta mezi odbornou veřejností, ale i mezi pacienty, která byla vedena hlavně ze strany národních referenčních laboratoří a velkých klinických pracovišť, vedla k uvědomění si následků, které má empirické podávání antibiotik. Prosazování doporučených postupů při předepisování antibiotik se projevilo v poklesu rezistence kmene *Streptococcus pyogenes* k erythromycinu.

Na začátku práce jsem si stanovila celkem šest cílů. Všechny se mi podařilo splnit. Obecné znalosti o bakterii *Streptococcus pyogenes* shrnuji v současném stavu a metody kultivace a identifikace popisuji v metodice. V ní je popsán i postup zjištění citlivosti kmene na daná antibiotika. Pomocí dotazníku vyplněného dětskými lékaři jsem si vytvořila ucelený obraz, jak většina lékařů postupuje při podezření na streptokokové onemocnění horních cest dýchacích. Všechna data o výskytu kmenů bakterie *Streptococcus pyogenes* a informace získané dotazníkem jsem uvedla v kapitole výsledky.

Prostřednictvím svého šetření jsem potvrdila hypotézu 3 a vyvrátila hypotézy 1 a 2. Sezónní výskyt kmenů pyogenního streptokoka byl v laboratoři Laboma mikrobiologická laboratoř s.r.o. nejvyšší na jaře. Vysvětlení můžeme najít v oslabení organismu po zimě, kdy se naše tělo musí bránit časté invazi respiračních virů. Dále jsem zjistila, že se rezistence kmenů *Streptococcus pyogenes* k makrolidům postupně snižuje. Pokud se budou i nadále dodržovat doporučené postupy v předepisování antibiotik, bude rezistence dále klesat. Mé šetření také ukázalo, že záchyt pyogenního streptokoka byl nižší než se uvádí v odborné literatuře. Jedním z důvodů je zřejmě ten, který vyplynul z dotazníku zpracovaného dětskými terénními lékaři. Při podezření na streptokokové onemocnění horních cest dýchacích neprovádí kultivační vyšetření a

aplikují antibiotika bez ověření původce onemocnění a jeho citlivosti. Odběr provedou teprve tehdy, pokud u pacienta potíže přetrvávají a klinický obraz onemocnění zůstane beze změny. V případě onemocnění kmenem pyogenního streptokoka a vhodně zvoleného antibiotika, se pak tato skupina výtěrů nedostane k laboratornímu vyšetření a ovlivní výslednou statistiku záchytu kmene v laboratoři. Další důvod spatřuji ve svém souboru zahrnující pouze děti do věku 12 let.

7. Klíčová slova

beta-hemolytické streptokoky - beta-hemolytic streptococci

faryngitida - pharyngitis

laboratorní diagnostika - laboratory diagnostics

makrolidy - makrolids

penicilin - penicilin

PYR-test - PYR-test

Streptococcus pyogenes - *Streptococcus pyogenes*

8. Seznam použitých zdrojů

1. bioMérieux SA. Api 20 Strep. Lyon: 2006. 07625G
2. Blechová, Zuzana. Časté komunitní infekce dětského věku a jejich léčba. *Pediatric pro praxi*, 2005, roč. 5, č. 2, s. 71-75. ISSN: 1213-0494.
3. *CDC Centres for Disease Control and Prevention* [online]. 3. dubna 2008, [citováno 18. října 2008]. dostupné z: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/groupastreptococcal_t.htm
4. *Česká lékařská společnost J. E. Purkyně* [online]. Smilek, Pavel. Sinusitis. [citováno 15. února 2009]. dostupné z: <http://www.cls.cz/seznam-doporucenych-postupu>
5. *Česká lékařská společnost J. E. Purkyně* [online]. Šlapák, Ivo. Bolest ucha. [citováno 15. února 2009]. dostupné z: <http://www.cls.cz/seznam-doporucenych-postupu>
6. DiaMondiaL. DAMONDIAL STREP KIT. Sees: 2005. DML 1001
7. *Fakultní nemocnice Olomouc. Ústav mikrobiologie* [online]. [citováno 23. března 2009]. dostupné z: <http://www.fnol.cz/labmet.jsp?lisId=-1510&lisLab=MIK&lisUni=>>
8. *Fakultní nemocnice Olomouc. Ústav mikrobiologie* [online]. [citováno 23. března 2009]. dostupné z: http://public.fnol.cz/www/mikro/MIKRO_Laboratorni%20manual_03_09.pdf
9. Göpfertová, Dana - Janovská, Daniela - Dohnal, Karel - Melicherčíková, Věra. Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena. 3. doplněné vydání. Praha: Triton, 2002. 148 s. ISBN: 80-7254-223-0

10. Hoza, Jozef a kolektiv. Konsensus používání antibiotik I.: penicilinová antibiotika. *Farmakoterapeutické informace*, 2002, č. 3, s. 1-4. ISSN: 1211-0647
11. Hoza, Jozef a kolektiv. Konsensus používání antibiotik: I. Penicilinová antibiotika (pokračování z čísla 3). *Farmakoterapeutické informace*, 2002 č. 4, s. 1-4. ISSN: 1211-0647
12. Hoza, Jozef a kolektiv. Konsensus používání antibiotik II.: Makrolidová antibiotika. *Farmakoterapeutické informace*, 2003, č. 9, s. 1-4. ISSN: 1211-0647
13. Hoza, Jozef a kolektiv. Konsensus používání antibiotik II.: Makrolidová antibiotika (pokračování z čísla 9). *Farmakoterapeutické informace*, 2003, č. 10, s. 1-4. ISSN: 1211-0647
14. Kolář, Milan - Lochmannová, Jindra. Antibiotická léčba nejčastějších bakteriálních infekcí u dětí v komunitě. *Pediatric pro praxi*, 2002, roč. 2, č. 6, s. 269-274. ISSN: 1213-0494
15. Krmenčík, Pavel - Kysilka Jiří. *Toxikon* [online]. Streptococcus pyogenes. [citováno 6. května 2008]. dostupné z:
<http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/streptococcus_pyogenes.php>
16. Křížová, Pavla. *Státní zdravotní ústav SZU* [online]. Erysipel - Manuál IV. 23. dubna 2008, [citováno 5. června 2008]. dostupné z:
<<http://www.szu.cz/tema/prevence/erysipel-manual-iv>>
17. Křížová, Pavla. *Státní zdravotní ústav SZU* [online]. Spála - Manuál IV. 23. dubna 2008, [citováno 5. června 2008]. dostupné z: <<http://www.szu.cz/tema/prevence/spala-manual-iv>>

18. Křížová, Pavla. *Státní zdravotní ústav SZU* [online]. Streptokokové nákazy (Streptococcus pyogenes) - aktualizovaný Manuál IV. 23. dubna 2008, [citováno 5. června 2008]. dostupné z: <<http://www.szu.cz/tema/prevence/streptokokove-nakazy-1>>
19. Křížová, Pavla. *Státní zdravotní ústav SZU* [online]. Syndrom toxického šoku - aktualizovaný Manuál IV. 29. srpna 2008, [citováno 12. září 2008]. dostupné z: <<http://www.szu.cz/tema/prevence/syndrom-toxickeho-soku>>
20. . *Lékařské laboratoře*. [online]. Tomášková, Věra. Rezistence na antibiotika u hlavních komunitních infekcí dle materiálů vyšetřených v mikrobiologické laboratoři v roce 2007. [citováno 26. března 2009]. dostupné z: <http://www.leklab.cz/cz/lekar/atb_stredisko.php>
21. *Lékařské laboratoře*. [online]. Tomášková, Věra. Rezistence na antibiotika u hlavních komunitních infekcí dle materiálů vyšetřených v mikrobiologické laboratoři v roce 2008. [citováno 26. března 2009]. dostupné z: <http://www.leklab.cz/cz/lekar/atb_stredisko.php>
22. Marešová, Vilma - Urbášková, Pavla. Phenoxyethylpenicillinum (penicilin V). *Remedia*, 2005, roč. 15, č. 3, s. 221-226. ISSN: 0862-8947
23. Marešová, Vilma - Urbášková, Pavla. Spiramycinum. *Remedia*, 2006, roč. 16, č. 1, s. 37-45. ISSN: 0862-8947
24. Modr, Zdeněk. Antibiotika a chemoterapeutika: stručný přehled pro praxi. Praha: lek pharma, 1995. 125 s.
25. Podstatová, Hana. Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena. 1. vydání. Olomouc: Epava, 2001. 265 s. ISBN: 80-86297-07-1

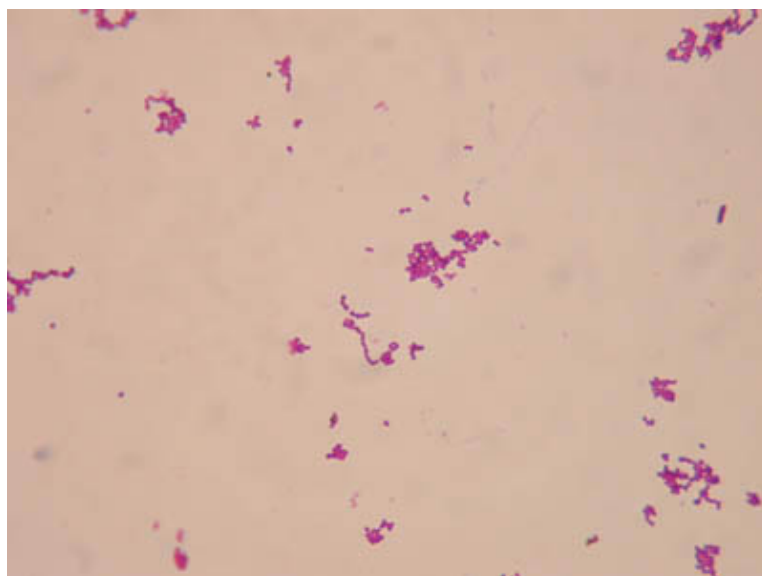
26. Ruoff, Kathryn L. - Whiley, R.A. - Beighton, D. Streptococcus. In Manual of Clinical Microbiology. Murray, PR et al. Volume 1. 8th Edition. Washington DC: ASM Press, 2003. s. 405-421. ISBN: 1-55581-255-4
27. Ryšáková, Lenka. *Lékařská fakulta UK v Hradci Králové* [online]. Bakteriologie. [citováno 23. března 2009]. dostupné z: <<http://www.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/diagnostika/bakteriologie.htm>>
28. TEST-LINE, Clinical Diagnostics spol. s r.o. PYRstrip 50. Brno: 2008. Ps0050
29. Velemínský, Miloš - Švihovec jr., Petr - Velemínský jr., Miloš. Infekce plodu a novorozence. 1. vydání. Praha: Triton, 2005. 414 s. ISBN: 80-7254-614-7
30. Votava, Miroslav a kolektiv. Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přepracované vydání. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN: 80-86850-00-5
31. Votava, Miroslav a kolektiv. Lékařská mikrobiologie speciální. dotisk. Brno: Neptun, 2006. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
32. Votava, Miroslav. Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. 1. vydání. Brno: Hortus, 2000. 408 s. ISBN: 80-238-5058-X
33. *Zdravcentra.cz* [online]. Čermák, Pavel - Förstl, Miroslav. Zásady odběru a zaslání biologického materiálu k bakteriologickému vyšetření u dětí. *Pediatric pro praxi*, 2003, roč. 3, č. 4, s. 186-190. ISSN: 1214-3227. dostupné z: <<http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/1083.pdf>>
34. *Zdravcentra.cz* [online]. Marešová, Vilma. Nejčastější chyby a omyly v antibiotické terapii dýchacích cest. *Pediatric pro praxi*, 2003, roč. 3, č. 6, s. 307-310. ISSN: 1214-3227. dostupné z: <<http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/1114.pdf>>

35. *Zdravcentra.cz* [online]. Spišák, Branislav. Rinosinusitídy v detskom veku. *Pediatric pro praxi*, 2003, roč. 3, č. 1, s. 16-19. ISSN: 1214-3227. dostupné z: <<http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbc/zc/1045.pdf>>

9. Přílohy

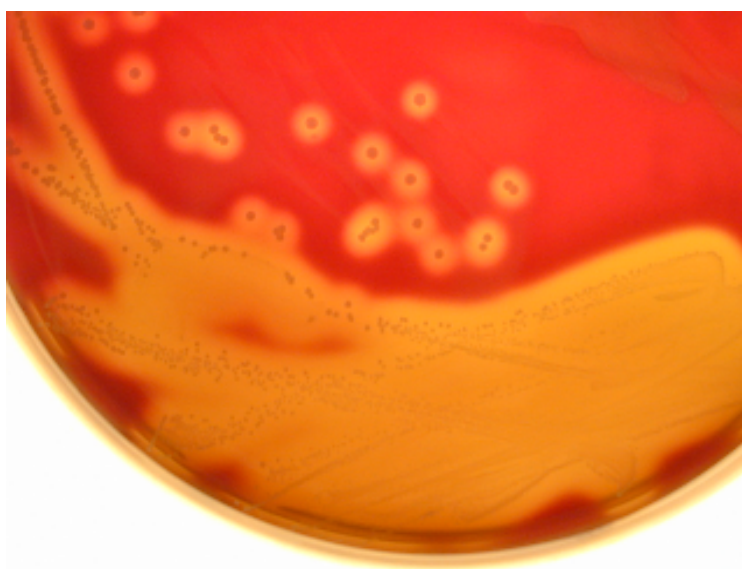
9.1 Obrázky

Obr. 2: Mikroskopie bakterie *Streptococcus pyogenes*



Zdroj: Lékařská fakulta UK v Hradci Králové

Obr. 3: Beta-hemolytické kolonie *Streptococcus pyogenes* na krevním agaru



Zdroj: Lékařská fakulta UK v Hradci Králové

Obr. 4: Souprava latexové aglutinace



Zdroj: DiaMondiaL (Diagnostic Mondial Laboratories)

9.2 Dotazník

Zdroj: Vlastní šetření

Dotazník

Jmenuji se Jaroslava Sivoková a studuji na Jihočeské univerzitě obor Zdravotní laborant. Tématem mé bakalářské práce je bakterie *Streptococcus pyogenes*, proto bych Vás nyní poprosila o vyplnění dotazníku, který bude součástí mé bakalářské práce. Dotazník je anonymní!!!

1. Čekáte na výsledek kultivace a citlivosti kmene na antibiotika při podezření na streptokokové onemocnění horních cest dýchacích?
 - a) ano
 - b) záleží na klinickém stavu pacienta, pokud je vážný nečekáme
 - c) ne

2. Jaké antibiotikum dáváte pacientům přednostně?
 - a) penicilin, pokud na něj pacient nemá alergii
 - b) zástupce ze skupiny makrolidových antibiotik
 - c) jiné

3. Pokud se u pacienta vyskytne alergie na penicilin, jaké antibiotikum nasadíte?

- a) zástupce ze skupiny makrolidových antibiotik
- b) zástupce ze skupiny linkosamidů
- c) jiné

4. Zvete si pacienty na kontrolu po prodělaném streptokokovém onemocnění horních cest dýchacích?

- a) ano
- b) podle stavu pacienta
- c) ne

pokud ano, kdy se má pacient na kontoru dostavit?

5. Provádíte při kontrole pacienta kontrolní výtěr z krku?

- a) ano
- b) u opakovaných infekcí ano
- c) ne

Děkuji za Vaši ochotu a čas

9.3 Použité zkratky

Tabulka 7: Zkratky

název	zkratka
pyrrolidonylaminopeptidáza	PYRáza
deoxyribonukleáza	DNáza
antistreptolyzin O	ASLO
antideoxyribonukleáza B	ADNB
streptokokové pyrogenní exotoxiny	Spe

buňky předkládající antigen	APC
syndrom podobný toxickému šoku	TSLs
penicilin vázající proteiny	PBP
Laboma mikrobiologická laboratoř s.r.o.	„Laboma“
extrakční reagentie	ER

Zdroj: Vlastní šetření