



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

# **Beta-hemolytické streptokoky v klinickém materiálu – jejich izolace a identifikace**

Vypracoval: Hana Kaňková

Vedoucí práce: MUDr. Radim Kramář, CSc

České Budějovice 2014

## Abstrakt

Tématem mé bakalářské práce jsou: „*Beta-hemolytické streptokoky – jejich izolace a identifikace*“. V návaznosti na toto téma jsem si stanovila i cíl pro zpracování, kterým je rozlišení *Streptococcus pyogenes* od ostatních beta-hemolytických streptokoků. Při třídění těchto bakterií jsem se omezila na množství, které pocházelo z kultivací krčních výtěrů.

Jako úvod do problematiky beta-hemolytických streptokoků, jsem zvolila stručné popsání bakteriální buňky – struktury a funkce jednotlivých organel. Pokračovala jsem částí zabývající se streptokoky obecně, v níž určuji jejich zařazení mezi bakterie, popisuji obecnou strukturu a jmenuji nejdůležitější kritéria pro jejich základní rozdělení, to zahrnuje i přesnější vymezení streptokoků beta-hemolytických. V následující části zmiňuji jejich zástupce, u kterých uvádím základní charakteristiku a zaměřuji se na vlastnosti, díky nimž jsou schopni u člověka vyvolat onemocnění. Konkrétní choroby řeším v souvislosti s bakterií *Streptococcus pyogenes*, jež je jejich nejčastější příčinou a krátce se zmiňuji i o jejich léčbě

Metodickou část jsem pojala jako celkový proces zahrnující preanalytickou, analytickou a postanalytickou fázi. V preanalytické části jsme se zabývala požadavkovým listem, odběrovým materiálem, transportem do laboratoře a rozdělením vzorků v laboratoři. Analytická část obsahuje všechny části zpracování konkrétního klinického materiálu (výtěr z krku). Zde se zmiňuji o kultivačních půdách, způsobu očkování a metodách určených k rozpoznání typu beta-hemolytických streptokoků. K tomu se využívá latexová aglutinace, případně automatický analyzátor MALDI Biotyper, který pracuje na principu hmotnostní spektrometrie. V závěru tohoto procesu, tedy v postanalytické fázi, jsem krátce popsala předání výsledků žadateli o vyšetření.

V kapitole obsahující výsledky mé práce, jsem zpracovala data o množství jednotlivých beta-hemolytických streptokoků za rok 2013, diagnostikovaných z krčního výtěru, které byly určeny laboratoří Synlab České Budějovice, pomocí metod uvedených v metodické části (PYR-test a latexová aglutinace).

Všechna data, získaná z laboratorního systému LIS, jsem vložila do souhrnné tabulky, s kterou jsem pracovala při vytváření dalších schémat, důležitých pro zodpovězení formulovaných hypotéz. Pro získání odpovědi na první hypotézu, v níž předpokládám, že výskyt beta-hemolytických streptokoků je po celý rok stejný, jsem vytvořila souhrnný sloupcový graf obsahující data za všechna zkoumaná období a spojnicový graf, pro jehož vznik jsem zhotovila tabulku, kde jsou zaznamenána množství všech beta-hemolytických streptokoků, v závislosti na ročním období. Pomocí těchto schémat jsem hypotézu vyvrátila.

Pro zodpovězení druhé hypotézy, ve které jsem zjišťovala, zda *Streptococcus pyogenes* početně převažuje nad ostatními diagnostikovanými typy beta-hemolytických streptokoků, jsem vytvořila jednoduchý výsečový graf, vycházející z tabulky, v níž jsou zapsané celkové počty jednotlivých beta-hemolytických streptokoků za zkoumaný rok. Díky tomuto názornému schématu jsem byla schopná hypotézu potvrdit, jelikož výseč ukazující *Streptococcus pyogenes* zabírá přes 80 % celkového množství beta-hemolytických streptokoků. K určitému potvrzení mých závěrů jsem došla při srovnání zkoumaného roku 2013 s rokem 2012, čemuž se blíže věnuji v kapitole diskuse.

V závěru práce bylo mým úmyslem zdůraznit důležitost výzkumu beta-hemolytických streptokoků, v souvislosti s jejich počtem a diagnostikovaným typem. To by mohlo být prospěšné v prevenci sekundárních komplikací, které mohou tyto streptokoky způsobit v případě neadekvátní léčby.

## **Abstract**

The topic of my bachelor's thesis is: „*Beta-hemolytic streptococci – their isolation and identification*“. In connection to this topic I set also the goal of the processing which is distinguishing of *Streptococcus pyogenes* from the other beta-hemolytic streptococci. During sorting these bacteria, I restricted the amount to those coming from cultivation of throat swabs.

As introduction to the issue of beta-hemolytic streptococci I selected a short description of bacterial cell – structure and function of individual organelles. I continued with the part dealing with streptococci in general, in which their classification as bacteria is determined, the general structure described as well as the most important criteria for their basic division, including also a more specific definition of beta-hemolytic streptococci . In the following part their representatives with their basic characteristic are mentioned. I focus on their attributes by which they are able to cause a disease of men. Particular diseases are analysed in connection with the bacterium *Streptococcus pyogenes*, which is the most frequency cause of diseases; also their treatment is mentioned shortly.

I outlined the methodical part as a total comprehensive process including the pre-analytic, analytic and post-analytic stage. In the pre-analytic part I dealt with the request sheet, sampling material, transport into the laboratory and split of samples in the laboratory. The analytical part contains all the parts of processing of a particular clinical material (throat swab). In this part, the culture medium for cultivation, way of inoculation as well as methods determined for recognizing the type of beta-hemolytic streptococci are mentioned. The latex agglutination is used for this, possibly also the automatic analyser MALDI Biotyper, working at the principle of mass spectrometry. At the end of this process i.e. in the post-analytical stage I described shortly handing over the results to the applicant for examination.

In the chapter containing the results of my work I processed the data on quantity of individual beta-hemolytical streptococci for the year 2013 diagnosed from the throat

swab, determined by the laboratory Synlab České Budějovice by means of methods stated in the methodical part (PYR-test and latex agglutination).

All the data acquired from LIS laboratory system were entered by me in a summarising table; I continued to work with this table during the creation of other schemes important for answering the formulated hypotheses. To acquire the answer to the first hypothesis in which I supposed that the occurrence of beta-hemolytic streptococci is the same all the year round, I created a summarising bar graph containing the data for all the examined periods and the line graph for the creation of which I prepared a table where the amounts of all the beta-hemolytic streptococci are recorded depending on season. By means of these schemes I refuted the hypothesis.

In the second hypothesis I tried to find out if *Streptococcus pyogenes* prevails in quantity over the other diagnosed types of beta-hemolytic streptococci; I created a simple sector diagram based on the table in which the total numbers of individual beta-hemolytic streptococci for the given year are entered. Thanks to this illustrative scheme I was able to confirm the hypothesis as the section showing *Streptococcus pyogenes* covers more than 80 % of the total number of beta-hemolytic streptococci. I achieved a certain confirmation of my conclusions by comparing the examined year 2013 with the year 2012, I devote closer attention to this comparison in the chapter "discussion".

My aim in the conclusion of the thesis was to accentuate the importance of the research of beta-hemolytic streptococci because of their quantity and diagnosed types. This could be beneficial for the prevention of secondary complication these streptococci may cause in case of a non-adequate medical treatment.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem 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 fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5.5.2014

.....

Hana Kaňková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu MUDr Radimu Kramáři, CSc. za jeho odborné vedení mé bakalářské práce, jeho ochotu, čas a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala všem zaměstnancům mikrobiologické laboratoře Synlab v Českých Budějovicích, jmenovitě však pani Vlastě Burdové, která mi pomáhala s praktickou částí.

## Obsah

1. Úvod.....	11
2. Teoretická část .....	13
2.1 Bakteriální buňka .....	13
2.1.1 Vnitřní struktury bakteriální buňky .....	14
2.1.2 Obalové a vnější struktury bakteriální buňky .....	16
2.2 Rod <i>Streptococcus</i> .....	19
2.2.1 Beta-hemolytické streptokoky .....	21
3. Cíl práce.....	29
4. Metodika .....	30
4.1 Preanalytická fáze .....	30
4.2 Vyplnění požadavkového listu (žádanky).....	31
4.2.1 Vlastní odběr.....	31
4.2.2 Přeprava materiálu .....	32
4.3 Analytická fáze.....	33
4.3.1 Kultivační půdy.....	33
4.3.2 Rozočkování a citlivost na antibiotika.....	34
4.3.3 PYR test .....	36
4.3.4 Latexová aglutinace .....	37
4.3.5 MALDI Biotyper .....	42
4.4 Postanalytická fáze.....	44
5. Výsledky .....	45
5.1 Souhrnné údaje o počtu streptokoků za rok 2013 .....	45



5.2	Procentuální zastoupení jednotlivých beta-hemolytických streptokoků v roce 2013 .....	47
5.3	Závislost výskytu beta-hemolytických streptokoků na ročním období.....	48
6.	Diskuse.....	49
7.	Závěr .....	52
8.	Seznam informačních zdrojů .....	53
9.	Klíčová slova .....	58
10.	Přílohy.....	59

## **Seznam použitých zkratk**

<b>GAS</b>	Group A streptococci – streptokoky skupiny A
<b>GBS</b>	Goup B streptococci – streptokoky skupiny B
<b>SOF</b>	Sérový opacitní faktor
<b>ATB</b>	Antibiotika
<b>LAP</b>	Leucin aminopeptidáza
<b>SSTS</b>	Streptokokový syndrom toxického šoku
<b>LIS</b>	Laboratorní informační systém

## 1. Úvod

Při vybírání tématu mé bakalářské práce jsem se nechala inspirovat aktuálními problémy lidí v mém okolí, kteří si často stěžovali na bolesti v krku a později jim byla diagnostikována tonzilitida (angína). Zajímalo mě proč tomu tak je, a co tuto nemoc způsobuje.

Nejvýznamnějším beta-hemolytickým streptokokem je *Streptococcus pyogenes*, který je nejčastější příčinou bakteriálních angín a to díky jeho vysoké patogenitě. Ostatní streptokoky s hemolýzou jsou již méně známé a způsobují podobná onemocnění jako *Streptococcus pyogenes*.

Angína je nejznámější chorobou způsobenou beta-hemolytickými streptokoky, postihující respirační trakt, ale málo kdo ví, že tyto bakterie se nemusí vyskytovat jen v krku, ale i v kůži. Jsou také příčinou hlubokých a invazivních infekcí, mezi něž patří seps, erysipel, nekrotizující fascitida apod. Výjimkou je *Streptococcus agalacticae*, který málokdy najdeme v běžné populaci, jako příčinu respirační infekce. Řešen je spíše v souvislosti s těhotnými ženami a následky jeho přítomnosti v jejich urogenitálním traktu pro dítě po narození.

Dnešním problémem v této tématice je záchyt beta-hemolytických streptokoků, protože ten je stěžejní pro léčbu následků. Při přechovení nemoci nebo při nedostatečné medikaci se mohou vyskytnout komplikace. Tyto komplikace zahrnují glomerulonefritidu, revmatickou horečku, meningitidu, sepsi, pneumonii a bakteriémii. Příjemným překvapením je u beta-hemolyzujících streptokoků jejich stále vysoká citlivost na penicilin.

Zmíněnou problematiku rozeberu více v teoretické části mé práce, kterou doplním metodikou zpracování klinického materiálu. Dále pak zpracuji data o počtu jednotlivých beta-hemolytických streptokoků pomocí tabulek a grafů v kapitole výsledky. Interpretací grafiky se budu zabývat v diskusi a v závěru zkoumanou problematiku shrnu.

Jako cíl této práce jsem si stanovila izolaci a rozlišení *Streptococcus pyogenes* od jiných beta-hemolytických streptokoků. Zároveň jsem však stanovila hypotézy, z kterých budu vycházet při interpretaci výsledků. První hypotézou je rovnoměrnost výskytu beta-hemolytických streptokoků během roku a druhou je předpoklad převažujícího počtu *Streptococcus pyogenes* nad ostatními typy. Tyto teorie se pokusím potvrdit nebo vyvrátit v kapitole diskuse.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Bakteriální buňka

Bakteriální buňka je ze 70 % složena z vody a zbylých 30 % tvoří chemické komponenty. Chemické komponenty (můžeme také nazvat sušinou) jsou složeny z 95 % makromolekulárních látek a 5 % anorganických iontů s fosfolipidy. Makromolekulami jsou vlastně 4 základní složky, které jsou obsaženy v jakékoliv buňce, tedy i v té bakteriální, ale odlišují se ve struktuře. Těmito základními komponenty jsou nukleové kyseliny, proteiny, lipidy a polysacharidy. Mezi makromolekuly bakteriální buňky patří DNA s 1 % obsahu, RNA s 6 %, proteiny zabírající 15 % a polysacharidy s 2 % (1, 2).

Bakterie jsou většinou zkoumány pod světelným mikroskopem, jímž můžeme zjistit jejich morfologické znaky, které napomáhají k identifikaci a klasifikaci. Kromě těchto znaků se k identifikaci a klasifikaci využívají i znalosti metabolismu bakterií a jejich genetická příbuznost. Základním morfologickým znakem bakterií je jejich tvar a uspořádání, které je dáno dělením. Tvar bývá dosti různorodý, ale běžně definujeme tvar tyčinkovitý, kulovitý nebo spirálovitý. Velikost jednotlivých bakterií se pohybuje v rozmezí mezi 0,2 mikrometry a 0,75 milimetry. Variabilita se odvíjí od způsobu života. Můžeme je nalézt na místech, kde by člověk nebo jiné organismy okamžitě zahynuly, což je dáno schopností adaptovat se (3, 4).

Když se zaměříme na strukturu bakteriální buňky, tak si prvně musíme říci, jaké části jsou pro její život nepostradatelné a jaké se vyvinuly během evoluce v reakci na životní prostor jednotlivých druhů. Nejdůležitějšími částmi prokaryotní buňky jsou buněčná stěna, pod kterou se nachází cytoplazmatická membrána oddělující cytoplazmu s jádrem, neboli nukleoidem, a ribozomy od vnějšího prostředí. Na povrchu můžeme někdy nalézt i fimbrie, bičíky, kapsulu či glykokalyx. Uvnitř inkluze, vakuoly, mezozómy, chromatofory nebo vytvořenou sporu (5, 2, 6).

## **2.1.1 Vnitřní struktury bakteriální buňky**

### **2.1.1.1 Cytoplazma**

Cytoplazma je roztok vyplňující vnitřek bakteriální buňky. Tento roztok je podobný gelu, jelikož jsou v něm obsaženy složky důležité pro metabolismus bakterií, jako jsou enzymy, bílkoviny (více jak 50 %), kyseliny a složky nerozpustné v cytoplazmě. Obsahuje tedy základní složky nutné pro funkci bakterie, jako je DNA, ribozómy a enzymy katalyzující různé reakce. Můžeme o ní říci, že je takovým odpadkovým košem a zároveň skladem, přičemž na rychlosti zde probíhajících dějů závisí život bakterie (5, 7, 6).

### **2.1.1.2 Bakteriální jádro (nukleoid)**

Nukleoid je vlastně jediná molekula, dvouvláknité deoxyribonukleové kyseliny (DNK), která se stáčí do kruhu pomocí kovalentních vazeb, i tak zaujímá asi 15 % prostoru buňky. Bakteriální jádro je nositelem genetické informace, obsahující určitý soubor genů, tedy genom, který řídí pochody v buňce. Těchto genů bývá kolem 3500 (4, 7, 3).

Bakteriální DNA si sebou nese i informace o vlastní replikaci. Replikace buňky začíná právě duplikací chromozomu, což je odstartované enzymem transkriptáza, jenž se váže na promotor (úsek DNA) ten aktivuje započetí transkripce, tedy přepis DNA na mRNA. Díky nepřítomnosti obalové membrány kolem jádra, mohou ribozomy, sloužící k výrobě bílkovin, nasednout přímo na mRNA a podle jejího kódu zařadit aminokyseliny, které přináší tRNA, a vytvořit tak kompatibilní peptidový řetězec až do terminální části. Tomuto ději říkáme translace. Během tohoto děje je chromozom přichycen na mezozómu. Na toto dělení kontinuálně navazuje příčné dělení celé buňky, charakterizované tvorbou přepážky ve středové rovině. Tímto jsou vytvořeny dvě, téměř totožné, buňky. Kromě transkriptázy může buněčné dělení odstartovat i příliš velký objem bakterie (6, 7, 3).

### **2.1.1.3 Ribozómy**

Ribozómy jsou složité útvary nacházející se hlavně v okolí bakteriálního jádra (60%), přilehlé k cytoplazmatické membráně (30%) a volné v cytoplazmě (10%) (5).

Ribozóm jako celek, je jedna struktura nazývaná se 70S s molekulovou hmotností  $2,7 \times 10^6$ , ta se však dá rozdělit na dvě části. Menší jednotce říkáme 30S a její molekulová hmotnost je  $0,9 \times 10^6$ . 50S je větší část o molekulové hmotnosti  $1,8 \times 10^6$ . Celá molekula ribozómu, tedy i její podjednotky, se skládá z několika molekul ribonukleové kyseliny (RNK). Menší podjednotka obsahuje jen jednu molekulu 16S ribonukleové kyseliny a 21 různých molekul bílkovin, zato velká podjednotka je složena ze dvou molekul RNA (58S a 23S) a 34 bílkovin. Dohromady ribozóm obsahuje 55 bílkovin a jen 2 z nich jsou stejného typu (5, 4, 7).

Hlavní funkcí ribozómů je syntéza bílkovin, která probíhá tak, že do mezery mezi podjednotkami se chytí mRNA, a ta podává informace tRNA o tom, jaká aminokyselina je na řadě v navázání na polypeptidový řetězec. Z tohoto tvrzení vychází, že v rostoucí fázi je ribozómů v buňce více, jelikož rychlost jejich proteosyntézy je stálá (800 aminokyselin/min). Počet roste ze stovek na tisíce (7, 3).

### **2.1.1.4 Vakuoly, inkluze, granula**

Každá buňka, ať roste nebo ne, potřebuje ke svému životu dostatek energie. I v klidové fázi je energie důležitá k udržení pochodu a organizace struktur stěžejních pro chod buňky. Proto potřebuje neustálý přísun živin, které transformuje na energii. Z tohoto důvodu, je buňka schopná uskladnit nepotřebnou energii do granul v cytoplazmě, kterým říkáme inkluze. V inkluzích se nachází povětšinou polysacharidy (glykogen), lipidy (kyselina poly- $\beta$ -hydroxymáselné), polyfosfáty, tukovité látky a někdy i síra. Inkluze jsou neobalené nebo obalené jednovrstevnou membránou. Vakuoly (plynové) se nacházejí hlavně u bakterií, jejichž životním prostorem je voda (7, 5, 6).

### **2.1.1.5 Mezozómy**

Tyto měchýřkovité struktury nalézáme přichycené na cytoplazmatické membráně grampozitivních bakterií a vznikají jejím vychlipováním. Pomáhají při dělení jádra a zbytku buňky (5).

### **2.1.1.6 Plazmidy**

Malé molekuly, obsažené v některých bakteriích. Obsahují přídatnou genetickou informaci, která upgraduje vlastnosti mikroba. Mezi tyto vylepšení může patřit: odolnost vůči některým antibiotikům, produkce toxinů, rezistence na těžké kovy apod (7).

## **2.1.2 Obalové a vnější struktury bakteriální buňky**

### **2.1.2.1 Cytoplazmatická membrána**

Hlavní bariéra prokaryotických organismů, kterou se odděluje cytoplazma, se všemi jejími strukturami, od vnějšího prostředí. Vzhledově je hladká a vypjatá, s tloušťkou kolem 8 nm. Její základní charakteristikou je dvojitá vrstva fosfolipidů. Kromě lipidů tvořících asi 30% hmotnosti membrány, jsou zde zastoupeny hlavně bílkoviny (7).

Cytoplazmatická membrána má dvě základní funkce. První funkce je izolační a vychází ze struktury fosfolipidové dvojvrstvy, která má na povrchu hydrofilní hlavičky a směrem dovnitř mastné kyseliny zajišťující hydrofóbnost. Membrána je semipermeabilní (polopropustná). Polopropustnost zajišťují bílkoviny vnořené (částečně nebo úplně) do cytoplazmatické membrány. Těmto bílkovinám říkáme permeázy. Ty transportují živiny dovnitř a odpad ven. Podobný účinek má také transmembránový receptor. Při jeho využití se však látky musí chemicky upravit. Tento transport je aktivní, a je k němu tudíž zapotřebí dodat energii (3, 6, 7).



Cytoplazmatická membrána je sídlem energetického metabolismu (přeměny živin), nahrazuje tak chybějící mitochondrie (dýchání). Krom toho, má na svém povrchu enzymy vytvářející buněčnou stěnu (6, 3).

### **2.1.2.2 Buněčná stěna**

Na cytoplazmatickou membránu navazuje tuhá buněčná stěna, která je plně propustná pro mnoha vysokomolekulárních i nízkomolekulárních látek. Její struktura je více přizpůsobená ochraně, a to vnitřní i vnější. Ze vnitř buňku ohrožuje tlak tekutiny na membránu (osmotický tlak), který by mohl způsobit její prasknutí. Z venku působí jako ochrana vůči chemikáliím, záření nebo vyschnutí (3, 7, 5).

Buněčná stěna všech bakterií je složena z vrstvy peptidoglykanů (mukopeptid, murein), což jsou polymery vytvořené ze dvou cukerných složek, spojených krátkými peptidy. Těmito složkami je kyselina N-acetylmuramová, z níž ční tetrapeptidy, které ji a N-acetylglukosamin vážou k sobě. Rozdíly nastávají až u složení stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií (5, 6).

Pro grampozitivní bakterie je charakterizující silná vrstva peptidoglykanů a směrem k povrchu vystupující vlákna kyseliny teichoové. Celá tato vrstva je silná asi 20 nm. Naopak stěna gramnegativních bakterií má slabou vrstvu peptidoglykanů, což je kompenzováno složitostí strukturní soustavy. Když budeme popisovat buněčnou stěnu gramnegativních bakterií od cytoplazmatické membrány, musíme určitě začít periplazmatickým prostorem. V tomto prostoru se nacházejí transportní a štěpné enzymy, včetně  $\beta$ -laktamázy. Následuje tenká vrstva peptidoglykanů, na které je usazená vnější membrána, složená ze dvou vrstev fosfolipidů. V ní jsou usazeny poriny, (bílkoviny propouštějící určité molekuly) a povrchové antigeny. Celá vrstva má šířku kolem 15 nm (3, 6, 7, 5).

U gramnegativních bakterií nenajdeme kyselinu teichoovou. U grampozitivních bakterií není periplazmatický prostor (6).

### **2.1.2.3 Bakteriální pouzdro**

Bakteriální pouzdro se nalézá nad buněčnou stěnou a je složeno buď z polysacharidů, nebo polypeptidů. Jsou v něm umístěny antigeny, které zvyšují virulenci patogenních kmenů jednotlivých bakterií a jejich odolnost vůči fagocytóze (7, 6).

Můžeme ho snadno odlišit od bakteriální stěny. Na něj může nasedat nestrukturovaná, řídká slizová vrstva nebo glykokalyx se svou vláknitou strukturou. Sliz i glykokalyx slouží hlavně k adhezenci na slizniční a jiné povrchy (3, 6, 7).

### **2.1.2.4 Bičíky**

Bičíky můžeme charakterizovat jako křehká, asi 20  $\mu\text{m}$  dlouhá a 20-30 nm silná vlákna, která lze vidět pomocí elektronového mikroskopu. Skládají se z bílkovinných podjednotek, neboli flagelinů, sdružujících se do 3 až 11 vláken. Ta se otáčejí kolem své osy a slouží k pohybu (3, 6, 5).

### **2.1.2.5 Fimbrie (pili)**

Fimbrie jsou neohebná vlákna délky 1-4  $\mu\text{m}$  a průměru od 7 do 10 nm. Skládají se z bílkovinných podjednotek uspořádaných do šroubovitě struktury. Vyskytují se jen u gramnegativních bakterií (po celém jejich povrchu). Jejich hlavní funkcí je adherence (7, 6).

Přítomnost bičíků a fimbrií u beta-hemolytických streptokoků není zmíněna v žádné, zde použité literatuře.

### 2.1.2.6 *Endospora*

Endospora je životní fáze některých grampozitivních bakterií (*Bacillus*, *Clostridium*), která nastane v případě postupného zhoršení životních podmínek. Beta-hemolytické streptokoky se tvorbou spor nevyznačují (7).

Vzniklý obal umožňuje bakterii přežít stovky let, i při vysokých teplotách, s možností vyklíčení při obnově příznivých podmínek. Nejznámějším případem jsou spory antraxu (5, 7).

## 2.2 Rod *Streptococcus*

Rod *Streptococcus* řadíme z taxonomického hlediska do řádu *Lactobacillales* a čeledi *Streptococcaceae*, přestože se v posledních letech jejich klasifikace změnila, díky studiím DNA. V dnešní době máme sedmnáct různých rodů, které jsou kataláza-negativními gram-pozitivními koky. Jsou mezi nimi i rody, které byly z rodu *Streptococcus* vyčleněny. Například *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Facklamia*, *Globicatella* a *Leuconostoc* (8, 9).

Když se vrátíme zpět k rodu *Streptococcus*, jehož koky jsou kataláza-negativní, gram-pozitivní a fakultativně anaerobní. Koky bývají menší než 2  $\mu\text{m}$  a nalézt je můžeme v párech nebo srostlé v řetízky (8, 7, 6).

Ochranou gram-pozitivních bakterií je bakteriální stěna, udržující jejich tvar a její hlavní složkou jsou peptidoglykany. Další složky zastupuje kyselina glukosaminová a muramická, ve formě amino-cukrů a galaktosaminů, které jsou její pohyblivou součástí. Zmíněné části jsou více méně shodné pro všechny druhy. Intra- a interdruhové rozdíly jsou podmíněny kyselinou teichoovou a povrchovými antigeny, jako je M protein a karbohydráty, které jsou přidruženy k buněčné stěně (10, 8, 7).

Neschopnost dýchacího metabolismu je zapříčiněna nedostatkem organických sloučenin hemu v jejich cytoplazmatické membráně. Ta je centrem energetického

metabolismu a zároveň odděluje bakteriální buňku od vnějšího prostředí. Nachází se pod buněčnou stěnou. V případě, kdy chceme podpořit metabolismus a růst bakterií, zvyšujeme tenzi oxidu uhličitého (8, 10, 7).

Jejich energetickému metabolismu říkáme fermentace. Dochází v něm ke zkvašování glukosy a některých karbohydrátů. Konečným metabolitem je kyselina mléčná. Další látkou, produkovanou rodem *Streptococcus*, je leucin aminopeptidáza tzv. LAP (8).

Bakteriální pouzdro neboli kapsula, je na povrchu těchto bakterií a tvoří ho polysacharidy. Hlavně lineární polysacharid zvaný kyselina hyaluronová. Kyselinu hyaluronovou řadíme mezi lineární polysacharidy. Tvoří ji dvě podjednotky: N-acetyl-D-glukosamin a D-glukuronovou kyselina. Jejím velkým plus pro mikroorganismus je, že nezpůsobuje u člověka tvorbu protilátek. Zároveň se podílí na ochraně bakterie proti imunitním mechanismům hostitele (10, 7, 11).

Díky odlišnostem, kterými se vyznačují jednotlivé druhy rodu *Streptococcus*, je můžeme rozdělit podle několika vlastností. Hemolýzy, stěnového antigenu C, biochemické charakteristiky, patogenity a místa nálezu. Za klasiku považujeme fenotypový typ dělení. Nejčastěji se setkáváme s rozdělením podle intenzity odbarvení erytrocytů okolo kolonií. Beta-hemolytické streptokoky (pyogenní), se vyznačují úplnou hemolýzou. Řadíme sem *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalacticae*, *Streptococcus dysagalacticae* ssp. *equisimiles* a řadu podmíněných patogenů. Podle tohoto rozdělení máme ještě typ alfa-hemolytický, který se vyznačuje změnou hemoglobinu na verdoglobin (hnědozelený). Poslední je typ gama-hemolytický, u nějž není hemolýza pozorována (10, 6, 7, 8, 9).

Druhým nejdůležitějším kritériem v dělení streptokoků je přítomnost stěnového polysacharidu C (dělení dle Lancefieldové), který se vyskytuje jen u druhů s hemolýzou typu beta. Specifičnost tohoto antigenu pak umožňuje odlišit beta-hemolytické streptokoky do tříd od A do Z. K identifikaci těchto tříd se využívá jednoduchý imunokomplexový typ reakce, latexová aglutinace (9, 8, 10).

Vzhledem k rozmanitosti rodu *Streptococcus*, zde můžeme narazit i na druhy, které jsou součástí přirozené mikroflóry (hlavně dutiny ústní). Druhy přímo patogenní pro člověka a podmíněné patogeny (primárním hostitelem je zvíře), se většinou uplatňují u imunoprivilegovaných osob (9, 7, 10).

### 2.2.1 Beta-hemolytické streptokoky

Mezi beta-hemolytické streptokoky, patří zejména *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalacticae* a další streptokoky, které jsou pro člověka patogenní. Mezi ty se řadí *Streptococcus dysagalacticae* ssp. *equisimilis* a druhy *Streptococcus anginosus*. Dalšími pyogenními koky jsou druhy napadající hlavně zvířata, ale jsou schopny se přenést i na člověka a vyvolat u něj onemocnění. K těmto druhům patří: *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus porcinus* a *Streptococcus canis* (6, 9).

#### 2.2.1.1 *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes* bývá označován zkratkou GAS, která ukazuje na jeho zařazení do skupiny typu A, dle stěnového antigenu s obsahem N-acetylglukosaminu a ramnózy (9, 7).

Tvoří drobné kolonie, jejichž grampozitivní koky jsou kulaté a lehce protáhlé. Koky jsou řazeny do dvojic až řetízků, přičemž u čerstvých kultur v tekuté půdě bývají složeny z několika desítek jedinců. Delší řetízky jsou tvořeny po dlouhodobější inkubaci (3, 6, 9, 7).

*Streptococcus pyogenes* má základní charakteristiky rodu *Streptococcus*, to znamená, že je fakultativně anaerobní, kataláza-negativní a oxidáza-negativní. Z těchto vlastností vycházíme při jeho kultivaci, která je poměrně náročná (6).

*S. pyogenes* roste na komplexních půdách obohacených sérem nebo krví. Pověštinou se využívá krevní agar s přidavkem beraní krve, optimálně by se však měla zvýšit i tenze CO<sub>2</sub>, která podporuje růst. Půdy s přidavkem glukózy nejsou moc vhodné, protože *S. pyogenes* je homofermentativní, což znamená, že z glukózy dokáže vytvořit kyselinu mléčnou, která může kultivační půdu výrazně okyselit, to může způsobit smrt streptokoků ve starších kulturách (7, 6, 9).

Na krevním agaru se tvoří drobné kolonie, jejichž vzhled je podmíněn disociační fází. „Trpasličí“ kolonie jsou suché a obklopené zónou úplné beta-hemolýzy. Ve větších koloniích rostou kmeny s opouzdřením a výrazným hlenovitým povrchem, jejich hemolýza bývá výraznější s nižším pH a tenzí kyslíku (6, 7, 9).

Účelem studie stavby *S. pyogenes* je nalezení struktur podstatných pro jeho patogenitu (7).

Z buněk *S. pyogenes* můžeme vyextrahovat stěnový polysacharid C (typu A). Dále stanovujeme bílkovinné antigeny, mezi které patří protein M, T a R. Nejdůležitějším z těchto povrchových struktur je antigen M, jenž se využívá v rozlišování určitých kmenů *S. pyogenes*. Přítomnost či nepřítomnost tohoto proteinu určuje, zda jde o kmen virulentní nebo nevirulentní. Umožňuje adhezi bakterie na sliznice, k čemuž mu dopomáhá i kyselina lipoteichoová. Jeho struktura je fibrilární a vystupuje na povrch bakterie. Vlákno se kotví v buněčné membráně jeho karboxyterminálními konci. Na část M-proteinu, která je hlouběji v buněčné stěně, bývá vázán regulační faktor komplementu H a fibrinogen. Tato část je shodná pro více jak 120 známých serotypů (7, 9, 6).

V situaci, kdy nelze kmen určit, dle variability volného konce M-proteinu, spoléháme na tzv. SOF, což znamená „sérový opacitní faktor“. Antigen T a R jsou určeny k prozatímnímu zařazení daného kmene (9, 7).

### 2.2.1.2 *Streptococcus agalacticae*

Bakterie je zařazena mezi beta-hemolytické streptokoky, a jelikož se ve stěně *S. agalacticae* nachází polysacharid C, tak zde můžeme identifikovat i antigen B. Můžeme jej nalézt také pod zkratkou GBS (7, 3, 9, 6).

*S. agalacticae* se kultivuje na krevním agaru, kde roste, ve srovnání s *S. pyogenes*, ve větších koloniích, které jsou mazlavé s neúplnou hemolýzou. Úplná hemolýza se u nich vyskytuje v přítomnosti zlatého stafylokoka, kdy vykazují i pozitivní CAMP-test. Tvorba oranžového pigmentu je závislá na nepřítomnosti vzduchu nebo přidavku škrobu do tekutých medií (6, 9, 7).

Ve stěně této bakterie je skupinově specifický antigen B a polysacharidové antigeny nacházející se v pouzdrech, ty bývají typově specifické. Polysacharidové antigeny rozdělujeme do 6 typů, z nich je nejdůležitější typ V a typ III vyskytující se u novorozenců (7, 9).

### 2.2.1.3 *Ostatní beta-hemolytické streptokoky*

Rozdělení těchto streptokoků je komplikované. I když se u nich vyskytují skupinové antigeny: C, F a G, tak to k identifikaci bohužel nestačí. Stejný antigen může být zakomponován i ve stěně jiného kmene (9, 7).

Další způsob rozdělení je dle velikosti kolonií. Mezi beta-hemolytické streptokoky s koloniemi většími než 0, 5 mm řadíme *Streptococcus dysagalacticae* ssp. *equisimilis*, který obsahuje, převážně stěnový antigen C. Dále sem řadíme druhy, napadající hlavně zvířata. Jejich patogenese v lidské populaci může být způsobena defektem imunity napadeného jedince (7, 9).

*S. equi* ssp. *zooepidemicus* patří do skupiny s antigenem typu C. *Streptococcus canis* skupiny G, je hlavním patogenem psů. *Streptococcus parvulus* patří do skupiny E, P, U nebo V. *Streptococcus iniae* má specifický antigen Z (9).

Malé kolonie na agaru vytvoří streptokoky skupiny *anginosus*, nebo také *Streptococcus milleri*. U druhů, které jsou začleněny do této skupiny, pozorujeme antigeny A, C, F nebo G. Může se však stát, že nebude obsahovat žádný. Beta-hemolytické bakterie patřící do této skupiny jsou 3: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* a *Streptococcus intermedius* (7, 9).

#### **2.2.1.4 Nemoci způsobené rodem *Streptococcus***

Beta-hemolytické streptokoky jsou příčinou onemocnění na celém světě, díky mechanismům, které jim umožňují obejít obranné linie hostitele. Tyto mechanismy nazýváme jako faktory virulence. K těmto faktorům řadíme povrchový protein M s jeho četnými serotypy, streptolysin O, pyrogenní toxiny (A, B, C), streptokinázu aktivující bakteriální plazmidy, streptodornázu štěpící nukleovou kyselinu a hyaluronidázu sloužící ke štěpení kyseliny hyaluronové (12, 8, 3).

Nejvýznamnějším beta-hemolytickým patogenem je *Streptococcus pyogenes*, který řadíme do skupiny A (GAS). Jeho patogenita je určena faktory, povrchovými nebo sekretovanými. Tyto faktory umožňují průnik, množení, šíření a únik imunitnímu systému hostitele. Těžké invazivní onemocnění je podmíněno vznikem superantigenů, (mitogenní exotoxin Z, pyrogenní exotoxiny (Spe)), sekretovanými streptokoky. Spe A vyvolává tvorbu TNF $\alpha$  a interleukinů (1, 2, 6) prostřednictvím vazby na T lymfocyty, které aktivují makrofágy. Na tomto procesu tvorby cytokinů, které aktivují mnoho buněk, se podílí i Spe B (cysteinová proteináza) a streptolysin O. Tato reakce může být příčinou systémového zánětu (8, 3, 2).

GAS je hlavním respiračním patogenem, který je izolován povětšinou z dýchacího traktu, horních cest dýchacích. Ložiskem infekce může být jak oblast krku, tak i kůže. Je nejčastější příčinou bakteriální faryngitidy. Dále pak způsobuje impetigo, infekce vnitřního ucha, prsních žláz, hluboké (erysipel) nebo invazivní infekce (bakteriémie, sepse), celulitidu a nekrotizující fascitidu. Ojedinele bývá příčinou myositidy, osteomyelotidy, septické artritidy, pneumonie, meningitidy, endokarditidy a



perikarditidy. Kmeny obsahující bakteriofág s genetickou výbavou, která umožňuje tvorbu pyrogenních exotoxinů. Ten způsobuje spálu a streptokokový syndrom toxického šoku (SSTS). U těchto infekcí je třeba, co nejdříve začít s léčbou, jinak může dojít k rozvinutí těžkých komplikací, probíhajících formou revmatické horečky a glomerulonefritidy. Ložiska a projevy, způsobené *Streptococcus pyogenes* mohou být závislé i na podnebném pásu. Krční infekce se vyskytují hlavně v mírném pásu a ty s kožními projevy v teplém pásu (2, 8, 12).

*Streptococcus agalacticae* se řadí do antigenní skupiny B (GBS) a poprvé byl identifikován v 19. století jako příčina mastitid skotů. Až od roku 1940 začal být spojován s novorozeneckými infekcemi. Dnes o něm mluvíme v souvislosti s novorozeneckou úmrtností, sepsí, meningitidou, pneumónií, chorioamniotidou, komplikacemi v šestinedělí (endometritida) a jinými perinatálními infekcemi (8, 14, 9).

Většinou ho nacházíme na povrchu poševní sliznice a jeho přítomnost má, ve značném počtu případů, bezpříznakový charakter. Virulentním faktorem je zde antigen B serotypu III s obsahem N-acetylneuroaminové kyseliny. Jejím úkolem je pozastavit rozeznání antigenu imunitním systémem hostitele, alternativní cestou (3, 9).

Nejvíce zkoumanou působností *Streptococcus agalacticae* je jejich vliv na novorozence a s tím je spojená diagnostika těchto koků u těhotných žen (osídlení jejich urogenitálního traktu) (8).

Novorozenecké infekce odlišujeme dle počátku onemocnění, na časně a pozdní. Časná novorozenecká infekce se manifestuje mezi prvním až sedmým dnem života dítěte. Projevem je sepse, pneumonie, meningitida nebo bakteriémie. K nakažení dojde při porodu, během průchodu porodním kanálem nebo předčasnému odtoku plodové vody. Následky pozdní infekce můžeme zpozorovat v intervalu od sedmého dne do třetího měsíce života a projevuje se jako meningitida nebo sepse. Těmto infekcím se snažíme předcházet screeningem těhotných žen a případnou léčbou intravenózním amoxicilinem, podávaným těsně před porodem (9, 8, 3).

GBS může ve vzácných případech nalézt i u dospělých mužů a žen, jinde než v urogenitálním traktu, a to v respiračním a zažívacím (bez klinických příznaků). Jinak jej nalezneme u imunoprivilegovaných pacientů trpících alkoholismem, diabetem, karcinomem nebo HIV (7, 8).

*Streptococcus dysagalacticae* ssp. *equisimilis* a druhy skupiny *Anginosus* mají mechanismy virulence podobné *Streptococcus pyogenes*, i jejich manifestace je stejná (infekce horních cest dýchacích a kůže). Avšak rozdíl je ve skupině *Anginosus*, která se velmi často vyskytuje jako součást přirozené mikroflóry dutiny ústní, traktu urogenitálního i gastrointestinálního (8).

#### 2.2.1.4.1 Stručná charakteristika některých infekcí způsobených *S. pyogenes*

Faringitida, neboli angína, je charakteristická náhlým počátkem, bolestí v krku, zvětšením a výrazným rudým zbarvením mandlí, mírnou horečkou a celkovou malátností. Mezi kožní projevy streptokokové nákazy patří puchýře s hnisem vyskytující se všude po těle. Tento typ příznaků, známe pod pojmem imetigo. Dalším kožním projevem jsou léze na dolních končetinách, zvané erysipel (10, 9, 2).

Spála je onemocnění způsobené jedním nebo více erytrogenními exotoxiny produkovanými *Streptococcus pyogenes*, ty se manifestují jako erytomatická vyrážka. Vyskytuje se v podpaží, tříselech a podbříšku (8, 10).

Streptokokový syndrom toxického šoku (SSTS) je způsoben toxiny, které jsou produkovány streptokoky. Ty slouží jako superantigeny vyvolávající tvorbu cytokinů a lymfokinů v organismu. Syndrom se projevuje poruchou koagulace, jaterními lézemi, akutním renálním selháním a nekrotizující fascitidou. Nalézáme ho mezi mladými dětmi s neštovicemi, u seniorů, diabetiků, lidí s chronickou srdeční nebo plicní chorobou, HIV pozitivních, alkoholiků a drogově závislých. Incidence u takto imunoprivilegovaných lidí je 200x vyšší (12, 8).

Nekrotizující fascitida je častou příčinou šokového syndromu, ale mluví se o ní i v souvislosti s masožroutci bakteriemi. Klasickými superantigeny jsou zde Spe (A, B, C, F) a M protein. Dochází zde k nekróze zasažených tkání, což se projevuje velkými bolestmi a ztrátou kožní citlivosti. Takto poškozená tkáň se musí, v pravý okamžik, chirurgicky odstranit. Dalším projevem streptokokové infekce je sepse, definovaná jako odezva orgánů a orgánových soustav na vpád mikroba do organismu. Tento stav může pokračovat i bez přítomnosti probíhající infekce (8, 2, 12, 14).

Hlavními následky neléčených nákaz, způsobených *Streptococcus pyogenes*, je revmatická horečka a glomerulonefritida. Rvmatická horečka nastává do tří dnů po prodělání angíny, ve 3 % případů. Způsobují ji pouze revmatoidní kmeny, jejichž povrchové antigeny jsou podobné antigenům srdečních chlopní a kloubů. Z tohoto důvodu začne imunitní systém hostitele produkovat protilátky, nejen vůči cizorodým látkám, ale i proti vlastním tkáním. V tomto případě, proti tkáni myokardu nebo kloubů (10, 15, 2).

Glomerulonefritida je způsobena imunokomplexy přítomnými v krvi, které se při průchodu ledvinami zachytávají na glomerulech a způsobují tak akutní nefritidu. Infekce je zapříčiněna nefritogenními kmeny GAS. Klinickými příznaky je: porucha renální funkce a makroskopická hematurie s mírnou proteinurií. Na venek můžeme pozorovat otoky tváře a víček (2, 16, 17).

#### 2.2.1.4.2 Léčba streptokokových nákaz

Většina streptokokových infekcí je léčena antibiotiky. Hlavně penicilinem, erytromycinem a klindamycinem. Prvně je vždy nasazen penicilin, v případě alergické reakce erytromycin podávaný sedm až deset dní v klasických dávkách. Populární je i kombinování antibiotik s různou účinností. Využívá se k tomu baktericidní klindamycin a bakteriostatický penicilin. Tato kombinace ovlivňuje hlavně pomalu rostoucí bakterie (12, 16).

Z hlediska rezistence je na tom nejlépe penicilin, na který je rezistentní nejmenší počet kmenů. Skupina A dále reaguje na klindamicin a erytromycin. Odolnost antigenních skupin B a G vůči klindamycinu s erytromycinem je již podstatně vyšší (18).

Další možností léčby, je použití intravenózních imunoglobulinů, ale v klinické praxi se nevyužívá tak často jako antibiotická léčba. Výhoda jejich aplikace je dána nízkými hladinami protilátek hostitele vůči antigenům streptokoků (12).

### **3. Cíl práce**

V bakalářské práci se zabývám beta-hemolytickými streptokoky identifikovanými ve výtěrech horních cest dýchacích, v mikrobiologické laboratoři Synlab v Českých Budějovicích. Z tohoto důvodu jsem si jako cíl stanovila, rozlišení *Streptococcus pyogenes* od ostatních beta-hemolytických streptokoků.

## 4. Metodika

Na výzkumu ke své bakalářské práci jsem pracovala v laboratoři Synlab v Českých Budějovicích, U Tří Lvů 4. Tato laboratoř je akreditována dle ČSN EN ISO 15189, zákona č. 226/2008 Sb., normy 422/2008 Sb. Je zde zaveden systém vnitřní kontroly kvality SMJ, zároveň se však účastní i vnější kontroly kvality EHK *Státního zdravotního ústavu v Praze* (20).

Laboratoř nabízí bakteriologická, serologická a parazitologická vyšetření, která provádí z běžných biologických materiálů (krev sérum, moč, stolice, výtěry). Sběr materiálu zajišťuje odloučené pracoviště U Tří Lvů 10 (20).

Konkrétní náplní mého výzkumu jsou výtěry z krku, odebrané v ordinacích lékařů a zpracované v této laboratoři v roce 2013. V těchto materiálech se zaměřuji na identifikované beta-hemolytických streptokoky.

Manipulaci s biologickým materiálem můžeme rozdělit do tří fází: preanalytické, analytické a postanalytické. Preanalytická fáze je dále rozdělena na činnosti odehrávající se mimo laboratoř a v laboratoři. Dohromady tvoří 56 % manipulace se vzorkem (21).

### 4.1 Preanalytická fáze

Do preanalytické fáze zahrnujeme přípravu pacienta, odběr vzorků, přepravu vzorku do laboratoře (což se děje mimo laboratoř), uchování a příprava vzorků ke zpracování (tyto dva děje se zajišťují již v laboratoři). Tyto děje jsou nejdůležitějším zdrojem chyb pro analytickou fázi, kdy díky nedodržení určitých zásad může dojít k poškození vzorků a následnému zkreslení laboratorních výsledků. Faktory ovlivňující preanalytickou fázi jsou: pacient, způsob odběru vzorku, uchování před analýzou a jeho příprava (21).

## **4.2 Vyplnění požadavkového listu (žádanky)**

První věcí, která se v preanalytické fázi musí udělat je vyplnit žádanku pro laboratorní vyšetření. Její správné vyplnění, a správné označení vzorku, je podmiňující pro přijetí materiálu k laboratornímu vyšetření (20).

V každé žádance, v jakékoliv laboratoři, je nutná identifikace pacienta, lékaře, typ materiálu a požadované vyšetření (20).

V předtištěné žádance je první kolonkou k vyplnění rodné číslo pacienta, následuje řádek příjmení a jméno. Dále se musí vyplnit základní diagnóza pacienta (v číselné podobě), jeho adresa, číslo pojišťovny (eventuelně zabarvit samoplátce), datum a konkrétní čas odběru. Identifikace lékaře (žadatele o vyšetření), začíná vyplněním jeho odbornosti a identifikačním číslem, dále pak musí přidat razítko a podpis. Poslední kolonkou je počet požadovaných vyšetření. Tato část je určena k identifikaci a bývá obsažena ve všech typech žádanek, někdy se můžeme setkat i s kolonkou, kde vyplňujeme pohlaví pacienta, současnou ATB léčbu apod (20).

Další částí žádanky je seznam vyšetření, která jsou požadována, v tomto konkrétním případě zaškrtneme odebraný materiál: krk a požadované vyšetření.

### **4.2.1 Vlastní odběr**

Před vlastním odběrem, který provádí sestra v ordinaci lékaře, se musí zkontrolovat, zda je správně vyplněna žádanka a jestli je k dispozici požadovaný odběrový materiál (22).

V ideálním případě by měl pacient přijít na lačno, tedy minimálně 2 hodiny před stěrem, neměl jíst ani pít, před ústní hygienou, neměl by si vyplachovat ústa a kouřit. Stěr by měl také proběhnout před začátkem antibiotické terapie (22, 23).

Pro výtěr z krku je třeba transportní odběrový tampón s Amiesovým médiem, jenž bývá ve sterilním balíčku (zvlášť tampón a zvlášť zkumavka s transportní půdou).

Před použitím, by sestra měla zkumavku označit alespoň příjmením pacienta a rodným číslem (datem narození), aby nedošlo k záměně vzorků. Následně by měla pacienta seznámit s průběhem odběru (20, 22).

Vlastní odběr probíhá tak, že se jazyk přitlačí dřevěnou špachtlí. Stěr se provede suchým odběrovým tampónem (viz příloha 1), z povrchu mandlí nebo z poškozené tkáně (pokud možno bez nabrání slin). Tampón se poté vnoří do zkumavky s půdou a vloží do plastického sáčku, spolu se žádankou (22).

Zkumavka s transportní půdou se využívá k zachování odebraných mikrobů, pokud možno v nezměněném stavu. V laboratoři Synlab využívají odběrové tampóny, které dodává společnost Med-Lab. Půdy zajišťují stálou vlhkost, pH udržují okolo 7,3 ( $\pm 0,2$ ) a je v nich obsaženo minimum nutričních zdrojů (bakterie tam nerostou). Díky tomu není třeba okamžitá přeprava do laboratoře ke zpracování. Společnost dodává tyto odběrové půdy ve dvou provedeních, které se odlišují jen málo. Půda bez aktivního uhlí, má usnadnit barvení dle Gramma a přímý průkaz antigenů. Médium s obsahem aktivního uhlí neutralizuje toxické produkty látkové výměny při růstu bakterií (24).

#### **4.2.2 Přeprava materiálu**

Odběrové půdy musí být do laboratoře ke zpracování dopraveny v den odběru, tedy co nejdříve. Toto zařizují svozová vozidla sjednaná laboratoří (20).

Vzorky od praktických lékařů by se měly přepravovat v chladicích boxech s udržovanou teplotou pohybující se od 4 do 8°C (chladničková teplota), maximálně může teplota vystoupat na 12°C. V laboratoři jsou pak vzorky roztříděny podle materiálu a způsobu zpracování (20).



### 4.3 Analytická fáze

Po přijetí vzorků, jsou laborantkou roztríděny a předány do příslušného oddělení laboratoře, kde se zpracují. Je jim přiřazen číselný kód sloužící jako identifikátor pro žádanky, zkumavky s materiálem a kultivační plotny.

Kroky při zpracování krčních výtěrů: příprava příslušných půd pro kultivaci, namazání vzorku, jeho rozočkování a vložení kultivačních půd do termostatu na 24 hodin. Následující ráno jsou lékařem odečteny, poslány k další analýze a vloženy zpět do termostatu, kde zůstanou do následujícího rána. Poté lékař znovu odečte plotny, a pokud na nich nevyrostou nové mikroorganismy, tak jsou zlikvidovány (po 48 hodinách).

#### 4.3.1 Kultivační půdy

V laboratoři mikrobiologické laboratoři Synlab odebírají kultivační půdy od společnosti *Biomérieux*. Tato společnost se zabývá širokou škálou činností na poli vědy, jednou z nich je i výroba kultivačních médií.

Dnes si naprostá většina mikrobiologických laboratoří, kultivační média sama nevyrobí. Důvodem je široká škála společností na trhu, které se jejich výrobou a prodejem zabývají. Ty jsou dostupná v požadované kvalitě a jejich cena je více než příznivá (25).

Pro kultivaci grampozitivních koků, které velmi často nalézáme v horním dýchacím traktu, používáme základní krevní agar zvaný Columbia CNA. Z tohoto krevního agaru se pak přidáním většího množství určitého suplementu mohou vytvořit půdy s vyšší selektivností, jako je například selektivní médium COBA (26).

Columbia CNA není selektivním kultivačním médiem jen pro streptokoky, ale i pro stafylokoky (26).

#### **4.3.1.1 Krevní agar Columbia CNA**

Základem této půdy je živný vývar z peptonů kaseinu, živočišných tkání a hovězího srdce natráveného pomocí trypsinu, který je doplněn škrobem (polysacharid sloužící jako zásobní látka). Nepostradatelnou základní složkou je také agar, vyráběný z rostlinných materiálů a NaCl zajišťující elektrolyty (26, 27, 25).

Přídavek 5 % beraní krve slouží jako stimulátor růstu pro kultivačně náročnější mikroorganismy, ke kterým streptokoky patří (25, 28).

K omezení růstu jiných bakterií, hlavně gramnegativních tyčků, slouží kolistin a kyselina nalidixová. Tyto složky jsou v podobě zkratky zmíněny v názvu půdy (CNA = colistin, nalidixic acid) (26).

#### **4.3.1.2 Selektivní médium COBA**

Tato půda vychází z Columbia CNA, ale přídavkem zde může být krev koňská (5%). Dalším rozdílem je její selektivní zaměření přímo na kultivaci streptokoků, a proto zde musí být přítomny suplementy omezující růst jiných bakterií. Těmito suplementy jsou kolistin a kyselina oxolinová, které zabraňují růstu jiných mikrobů, kromě streptokoků (26, 29).

#### **4.3.2 Rozočkování a citlivost na antibiotika**

Před zpracováním vzorků, si musíme připravit pracovní pomůcky (viz příloha 2). V tomto případě je to: příslušné množství základních kultivačních půd Columbia CNA, vzorky, očkovací kličky (v rutinní praxi kovové), plynový kahan používaný jako sterilizátor a popisovací fix. Další pracovní pomůckou jsou antibiotické disky penicilinu a erytromycinu, které vkládáme do misky pomocí injekční jehly.

#### 4.3.2.1 Pracovní postup

- a) Prvním krokem je zapnutí kahanu, který dáme tak, aby při každém otočení stojanu plamen rozžhavl klíčku, čímž jí sterilizuje. Před začátkem očkování všechny klíčky sterilizujeme, abychom se ujistili, že nedojde ke kontaminaci.
- b) Kultivační médium popíšeme trojmístným číslem, abychom určili jeho příslušnost k určité žádance.
- c) Vezmeme si zkumavku s odběrovým tampónem a na 1/3 kultivační misky namažeme vzorek. Při roztírání vzorku tampónem otáčíme, abychom po kultivaci dostali celiství výsledek. Namazané části říkáme inokulum.
- d) Po namazání přijdou na řadu kovové klíčky. Uchopíme klíčku a její jednou stranou vedeme několik šikmých čar z inokula (nejlépe 5). Klíčku obrátíme a z rozočkovaných čar vedeme další. Použitou klíčku zavěsíme na stojan a posuneme nad kahan. Vezmeme novou klíčku a postupujeme stejně jako s první. Při rozočkování se snažíme využít celou plochu plotny, ale zároveň dáváme pozor, abychom nezasahovali do dříve rozočkovaných částí.
- e) Na závěr položíme antibiotické disky, jimiž zjišťujeme citlivost bakterií na příslušná antibiotika (penicilin, erytromycin). Injekční jehlou napíchneme antibiotické disky a položíme je do inokula. Disky jsou od sebe přibližně 2 cm.
- f) Kultivační misky naskládáme na sebe a vložíme do termostatu, kde je udržovaná teplota 37, 5°C, vhodná pro kultivaci. Tam zůstanou do následujícího rána, kdy je lékař odečte a pošle na další testy (viz příloha 3).

Vzorky v laboratoři zůstávají 48 hodin a poté jsou zlikvidovány jako infekční odpad. Všechny výsledky jsou zaznamenány v počítači, pomocí informačního laboratorního systému (20).

### 4.3.3 PYR test

V laboratoři Synlab se k diagnostice *Streptococcus pyogenes* využívá PYR test od společnosti TestLine (viz příloha 4), jenž se zabývá výrobou sestav pro mikrobiologickou diagnostiku. Přesný název tohoto výrobku je PYRstrip (30).

V tomto konkrétním případě, u kultivací krčních výtěrů, kdy lékař vidí kolonie s výraznou hemolýzou, se PYRstrip používá k odlišení *Streptococcus pyogenes* od dalších hemolytických streptokoků. Dále je také využitelný v případě, kdy chceme rychle odlišit enterokoky od streptokoků skupiny D. Pozitivní výsledek lze zpozorovat i u *Lactococcus lactis*, *Aerococcus* a *Gamella* (30).

PYRstrip funguje na základě enzymatických reakcí. Přesněji jde o průkaz přítomnosti pyrolidonyl peptidázy, která je produkována zmiňovanými druhy mikroorganismů. Dalším důvodem použití tohoto testu je jeho citlivost, spolehlivost a rychlost. Doba testu se pohybuje od 6 do 10 minut (30).

#### 4.3.3.1 Obsah sestavy

V sestavě od této společnosti nalezneme krabičku obsahující 50 kusů testovacích proužků, na nichž je papírová zóna nasycená chromogenním substrátem. Ten slouží jako důkaz pyrolidonylpeptidázy. Dále tam najdeme vyvíjecí činidlo, přesněji (1 ml v tmavé lahvičce) a 1 pipetu (30).

#### 4.3.3.2 Skladování a doba expirace

Testovací souprava se skladuje při teplotě pohybující se od +2 do +8 °C, tedy při ledničkové teplotě. Pokud dodržíme tyto skladovací podmínky, tak je sestava použitelná po dobu 1 roku od data výroby, který nalezneme na obalu. Tuto dobu můžeme prodloužit skladováním při -20°C (30).

Před použitím necháme sestavu nějakou dobu při běžné laboratorní teplotě. Musíme si dát pozor, aby vyvíjecí činidlo nebylo delší dobu na světle (před použitím ho dáme na tmavé místo) (30).

#### **4.3.3.3 Pracovní postup**

- a) Vezmeme testovací proužek a diagnostickou zónou setřeme hemolytické kolonie z kultivační misky. Proužek položíme na misku, z níž jsme kolonii odebírali. Necháme kultivovat přibližně 5 minut při laboratorní teplotě. K nanesení můžeme použít také jednorázovou kličku (30).
- b) Poté na každou diagnostickou zónu naneseeme, pomocí pipety, kapku (5 µl) vyvíjecího činidla (30).
- c) Nejpozději do 5 minut odečteme výsledek (30).

#### **4.3.3.4 Interpretace výsledků**

V případě pozitivní reakce, se místo, kam jsme nanесли kolonie, zbarví červeně. U negativního výsledku k zbarvení nedojde. V případě, kdy se nám zdá zbarvení nedostatečné, je jistotou udělat test pomocí latexové aglutinace. Podobně postupujeme i v případě, kdy je výskyt hemolytických kolonií ojedinělý a po provedení PYR testu bychom neměli dost kolonií pro další testování (30).

#### **4.3.4 Latexová aglutinace**

Pokud neidentifikujeme beta-hemolytického streptokoka jako *Streptococcus pyogenes* pomocí PYR testu, tak se v laboratoři Synlab využívá sestava pro identifikaci rodu *Streptococcus* od společnosti DiaMondial.

Jelikož nelze určit druh streptokokové infekce dle klinických příznaků, využívá se k identifikaci tato sestava. Funguje na principu chemické extrakce specifických

uhlohydrátových antigenů ze stěny bakterií (antigeny dle Lancefieldové) pomocí činidla s určitým obsahem kyseliny dusné. Ta působící jako konzervační látka. Pokud se antigen ze stěny bakterie vyextrahuje, spojí se s latexovými partikulami obsaženými v roztocích dané sestavy (31).

V sestavě dodávané společností DiaMondiaL nalezneme 4 lahvičky s extrakčním činidlem, 6 lahviček s protilátkami ke zjištění typu streptokoka a 1 lahvičku s kontrolním roztokem. Dále jsou zde k dispozici tyčinky na rozmíchání a aglutinační kartičky vyrobené z bílého, tvrdého papíru. Kartičky mají 8 kruhových areálů pro rozmíchání reakčních činidel (31).

Reagencie jsou předpřipraveny a lze je rovnou použít. Obsah lahviček vystačí přibližně na 60 skupinových testů. Odhad musíme brát s rezervou, protože některé reagencie jsou využívány více než jiné, proto lze jednotlivé části sestavy dokoupit samostatně (31).

#### **4.3.4.1 Reagencie**

##### *4.3.4.1.1 Extrační činidla*

V sestavě jsou k dispozici 3 hotové roztoky, pomocí nichž vyextrahujeme stěnové antigeny z bakterií rodu *Streptococcus* (viz příloha 5). Roztoky jsou v lahvičkách sloužících jako kapátka, jsou označeny různými barvami. Na etiketě je jasně znázorněné číslo extraktoru (31).

Extrakční roztok 1, má víčko žluté barvy a obsahuje 3,2 ml extrakční látky s 0,1% obsahem kyseliny sodné sloužící jako konzervační látka. Extrakční roztok 2 je označen červenou barvou a stejně jako u roztoku 1, je zde 3,2 ml účinného roztoku, ale neobsahuje kyselinu sodnou. Extrakční roztok 3 je v sestavě dvakrát po 4 ml, barva zavírání je modrá a jako u prvního roztoku, je zde obsažena konzervační látka (kyselina sodná) (31).

#### 4.3.4.1.2 *Latexová suspenze*

V balení nalezneme také 6 lahvíček se 3 ml modrých latexových partikulí (viz příloha 6), jež jsou obaleny přečištěnými králičími protilátkami skupiny A, B, C, D, F a G. Obalené partikule jsou rozptýleny v roztoku pufru o pH 7,4 a s 0,1% obsahem kyseliny sodné - konzervant (31).

Roztoky obsahující potřebné protilátky, jsou stejně jako extrakční roztoky, v lahvičce sloužící jako kapátko, barevně rozlišitelné a označené písmenem, dle antigenů Lancefieldové (A, B, C, D, F, G).

#### 4.3.4.2 *Uchování a stabilita*

Sestavu pro identifikaci streptokoků bychom měly uchovávat v lednici při teplotě od 2 do 8°C. Za žádných okolností jí nemůžeme dát do mrazáku (31).

Pokud se budeme řídit základních doporučení, tak by reagentie měly zůstat stabilní a lze je využívat až do data expirace. To by mělo být uvedeno na každém dodaném balení (31).

Výrobce doporučuje nevyužívat reagentie po datu expirace a upozorňuje, že sestava je určena pouze pro *in vitro* diagnostiku. Samozřejmostí je povinnost dodržovat skladovací podmínky. V návodu je také upozornění na vyšší reaktivitu kyseliny sodné s mědí a možnost jejího akumulování, na což je třeba dávat pozor i přes velmi malý obsah kyseliny dusné v roztocích (31).

#### 4.3.4.3 *Pracovní postup*

Před započítím testů, bychom měly soupravu nechat nějakou dobu stát při pokojové teplotě (vzdušná teplota od 22°C do 28°C).

#### 4.3.4.3.1 Příprava extraktu

- a) Do stojánku si dáme požadované množství eppendorfek, které popíšeme čísly daných ploten.
- b) Do každé z popsaných eppendorfek dáme jednu kapku extrakční reagensie číslo 1 (žluté kapátko).
- c) Poté si vezmeme kultivační půdu s vyrostlými streptokoky, které pro aglutinaci určil lékař, a vybereme několik kolonií s výraznou hemolýzou. U kultivací s ojedinělou hemolýzou je lékař zakroužkuje. Setřeme pomocí jednorázové kličky. Následně kličku ponoříme do extraktoru v mikrozkušavce a vyklepeme, tak aby setřené kolonie zůstaly v tekutině. Tento postup opakujeme u všech kultivačních ploten. Při odebírání kolonií si musíme dávat pozor na čistotu odběru.
- d) V následujícím kroku přidáme do každé mikrozkušavky po jedné kapce extrakční reagensie číslo 2 (červené kapátko).
- e) Po přidání extraktoru 2, vezmeme mikrozkušavky ke třepačce, zapneme jí a postupně zkkušavky přikládáme k rotujícímu kruhu na 5-10 sekund. Tato část postupu slouží k promíchání přidávaných reagensií a bude se opakovat ještě jedenkrát.
- f) Dalším krokem, po promíchání, je přidání 5 kapek extraktoru 3 (modré kapátko).
- g) Opakujeme promíchání činidel s koloniemi, pomocí třepačky.
- h) Do každé eppendorfky vložíme jednorázové kapátko.

Po promíchání je roztok připravený k použití a následuje vlastní testování příslušných skupin beta-hemolytických streptokoků (31).

#### 4.3.4.3.2 Vlastní testování

- a) Před samotným testováním skupin si připravíme příslušné množství testovacích kartiček, na nichž je 8 testovacích polí, a tyčinky k rozmíchání vzorků.



- b) Nejdříve si do testovacích polí kápne 1 kapku latexových partikulí označených písmenem A, jímž určíme *Streptococcus pyogenes*. V sestavě společnosti DiaMondial kapátko s fialovým víčkem,
- c) Poté do každého pole přidáme ještě kapku extraktu, který jsme si předtím připravili.
- d) Obě reagentie rozmícháme po celém testovacím poli pomocí jednorázové tyčinky (párátka).
- e) Když rozmícháme reagentie ve všech polích, vezmeme testovací kartičku do ruky a kývavými pohyby více promícháme obsah polí.
- f) Přibližně do jedné minuty by se měly objevit aglutináty (sraženiny), pokud je vzorek pozitivní na *Streptococcus pyogenes*.
- g) Pozitivní vzorky vyřadíme z dalšího testování a dle stejného postupu pokračujeme s latexovými partikulemi proti streptokokům typu C. Pokud nějaké vzorky stále nevykazují pozitivní výsledek, nebo je aglutinát neprůkazný, pokračujeme s protilátkami týmu B, G a pak F.

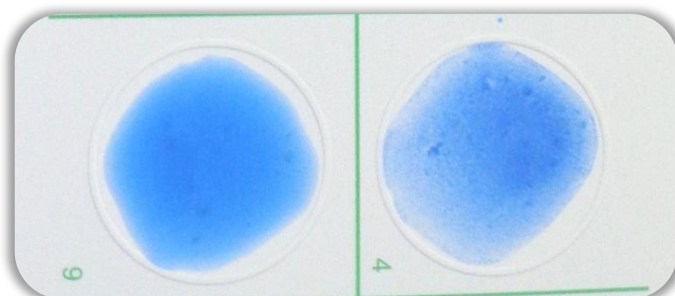
Testování skupin v pořadí A, C, B, G a F se provádí na základě zkušeností, což je užitečné při šetření reagentií.

#### 4.3.4.3.3 Hodnocení výsledků

Pozitivní výsledek vyhodnotíme: v případě rychlého objevení výrazného shluku latexových partikulí formujících se v aglutináty (sraženiny). Pokud je jich velmi málo a jsou nevýrazné, test opakujeme, nebo přikročíme k testu další skupiny (viz obrázek 1). Výsledek hodnotíme, jako negativní. (31)

**Pozitivní**

**Negativní**



**Obrázek 1: Hodnocení latexové aglutinace**

Zdroj: Vlastní fotografie

#### **4.3.5 MALDI Biotyper**

V mikrobiologické laboratoři Synlab používají k identifikaci různých mikroorganismů, přístroj od společnosti Bruker s.r.o., jehož název je MALDI Biotyper.

MALDI Biotyper můžeme využít v identifikaci gram-negativní a gram-pozitivních bakterií, kvasinek a mnohobuněčných hub. Většinou se využívá jen v případě, kdy selhala identifikační metoda přímého přenosu (32, 33).

Přístroj funguje na principu hmotnostní spektrometrie, která je v tomto případě nazývaná MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight). Zařízení používá laseru, jehož paprsek zasáhne terčik s naneseným vzorkem. To způsobí uvolnění ribozomálních proteinů, které jsou charakteristické pro určitý typ mikroorganismu. Ribozomální proteiny pak putují evakuovanou trubicí přístroje směrem k detektoru. Právě tuto dobu letu (Time of Flight) přístroj měří a pomocí kalibračních konstant ji přepočítává na hmotnost jednotlivých proteinů. Naměřenou

hmotnost pak srovná se svou knihovnou a dle míry schody určí mikroorganismus (33, 34).

Kdykoli během chodu tohoto přístroje, lze činnost zastavit a nastavit nové parametry (34).

V případě beta-hemolytických streptokoků si většinou vystačíme s PYR-testem nebo latexovou aglutinací, ale lze je k jejich identifikaci využít. Spolehlivě určí *Streptococcus agalacticae*, v ostatních případech určí příslušnost dle Lancefieldové, ale příslušný druh nemusí být správně.

#### **4.3.5.1 Pracovní postup**

- a) Připravíme si plotny s vykultivovanými bakteriemi, MALDI destičku, kličky nebo dřevěná párátka k nanesení kolonie, MALDI matrici, pipetu s jednorázovými špičkami a záznamový arch.
- b) Na záznamový arch si zapíšeme číslo plotny a můžeme přidat i poznámku o odebrané kolonii.
- c) Příslušnou kolonii odebereme pomocí kličky nebo párátka a nanese do malého kruhového prostoru, na destičce. Destička má kromě nanášecích ploch číselné a písmenné označení. Ve vodorovném směru jsou čísla a ve svislém písmena, což je tam kvůli přehlednosti. Pro ještě lepší orientaci je stejně označen i záznamový arch.
- d) Po nanesení vzorků na destičku si vezmeme pipetu se špičkou, do ní nabere 1  $\mu$  MALDI matrice a přidáme na vzorek. Na každý nanesený vzorek použijeme novou špičku, abychom předešli kontaminaci.
- e) Matrici necháme zaschnout a destičku vložíme do přístroje, kde zapíšeme nově vložené vzorky a spustíme měření. Během několika minut nám pak přístroj poskytne výsledky. Tyto výsledky jsou softwarem přístroje uchovány jeden den (35).

#### **4.3.5.2 Postup čištění MALDI destiček**

MALDI destičky lze opakovaně použít. Většinou se využívají, dokud je na nich volný nanášecí prostor, a poté jsou čištěny dle vlastního postupu.

##### **4.3.5.2.1 Postup**

- a) Destičku vložíme do misky a její povrch polejem 70 % etanolem, který necháme působit 5 minut (35).
- b) Etanol opláchneme pod tekoucí horkou vodou, otřeme ubrouskem namočeným do 70 % etanolu a celý proces opakujeme (opláchnout a otřít). Při sušení se ubrousek již nenamáčí do etanolu (35).
- c) Další práci provádíme v digestoři a využíváme rukavic (35).
- d) Destičku pokryjeme 100  $\mu$ l 80 % kyseliny trifluoroctové (TFA) a poté pečlivě všechny plochy otřeme ubrouskem. (35)
- e) Destičku necháme alespoň 15 minut schnout - při laboratorní teplotě (35).
- f) Zkontrolujeme, zda na destičce nezůstaly nějaké nečistoty a vložíme ji do obalu, aby byla připravena k dalšímu použití (35).

#### **4.4 Postanalytická fáze**

Laboratoř garantuje dodání vytištěných výsledků, žadateli o vyšetření, do 48 hodin. Do vlastních rukou výsledek dostane jen samoplátce, který svůj vzorek doručil do laboratoře osobně a na žádance je jasně uvedeno, že si výsledek osobně vyzvedne. Výsledkový list je mu vydán po prokázání totožnosti (20).

## 5. Výsledky

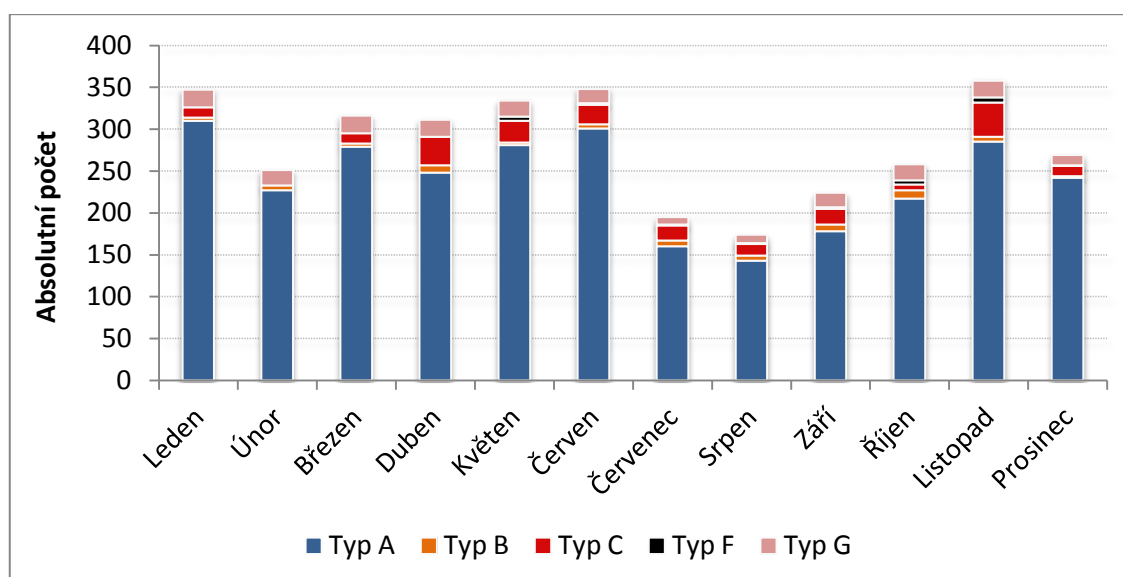
V kapitole výsledky graficky zpracovávám údaje získané z informačního systému LIS, v Laboratoři Synlab České Budějovice. Tyto zpracované hodnoty vypovídají o četnosti výskytu beta-hemolytických streptokoků během roku 2013

### 5.1 Souhrnné údaje o počtu streptokoků za rok 2013

Do tabulky 1 jsem vložila všechny získané údaje, ty jsem poté využila při tvorbě následujících tabulek a grafů. Konkrétně obsahuje absolutní počty jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků, za jednotlivé měsíce, k nimž jsem dopočetla procentuální zastoupení těchto bakterií. Všechny sloupce jsou doplněny o řádek s celkovými hodnotami.

Graf 1 je skládaným sloupcovým grafem vytvořeným pomocí absolutních hodnot ze souhrnné tabulky (Tabulka 1). Znárodnuje zastoupení beta-hemolytických streptokoků v jednotlivých měsících.

**Graf 1: Zastoupení jednotlivých beta-hemolytických streptokoků během roku 2013**



Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře Synlab v Českých Budějovicích; vlastní zpracování

**Tabulka 1: Souhrnná tabulka**

Druh streptokoka	A		B		C		F		G	
	Absolutně	Relativně (%)	Absolutně	Relativně (%)	Absolutně	Relativně (%)	Absolutně	Relativně (%)	Absolutně	Relativně (%)
<b>Leden</b>	310	11	4	6	12	6	0	0	21	10
<b>Únor</b>	227	8	6	9	0	0	0	0	18	9
<b>Březen</b>	279	10	4	6	12	6	0	0	21	10
<b>Duben</b>	248	9	9	13	34	16	0	0	20	10
<b>Květen</b>	281	10	3	4	26	12	5	22	19	9
<b>Červen</b>	301	10	5	7	23	11	2	9	17	8
<b>Červenec</b>	160	6	7	10	18	8	1	4	9	4
<b>Srpen</b>	143	5	6	9	14	6	1	4	10	5
<b>Září</b>	178	6	8	11	19	9	2	9	17	8
<b>Říjen</b>	217	8	10	14	7	3	5	22	19	9
<b>Listopad</b>	285	10	6	9	41	19	6	26	20	10
<b>Prosinec</b>	242	8	2	3	12	6	1	4	12	6
<b>Celkem</b>	<b>2871</b>	<b>100</b>	<b>70</b>	<b>100</b>	<b>218</b>	<b>100</b>	<b>23</b>	<b>100</b>	<b>203</b>	<b>100</b>

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře Synlab v Českých Budějovicích; vlastní zpracování

## 5.2 Procentuální zastoupení jednotlivých beta-hemolytických streptokoků v roce 2013

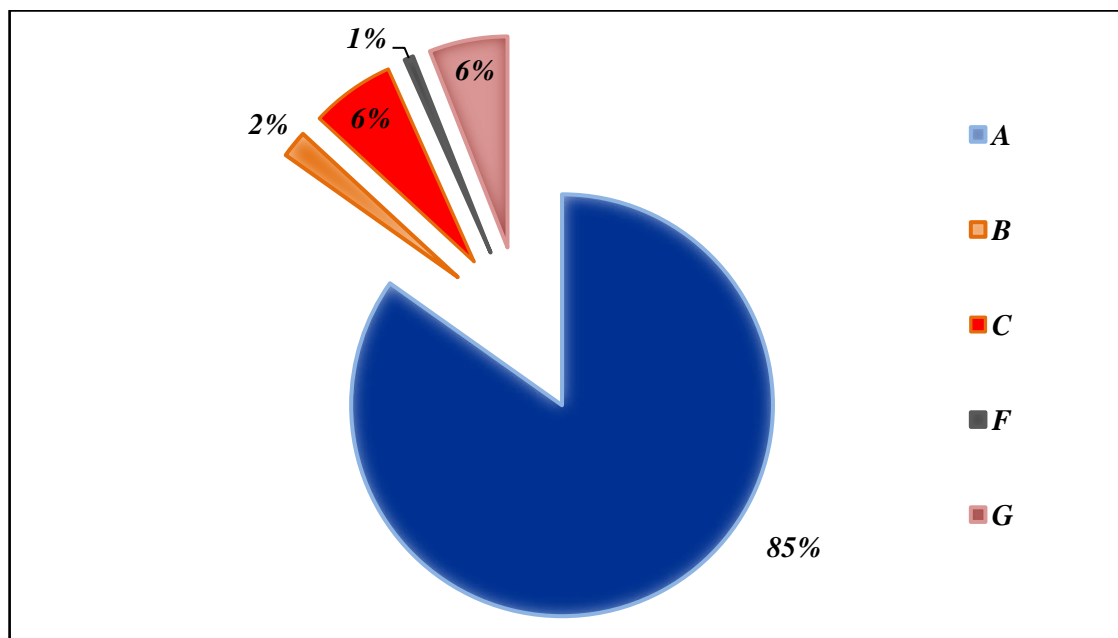
Tabulka 2 je základem pro vytvoření grafu 2. Ten představuje procentuální zastoupení jednotlivých beta-hemolytických streptokoků v roce 2013.

**Tabulka 2: Absolutní a relativní počty**

Typ	Absolutně	Relativně (%)
A	2871	85
B	70	2
C	218	6
F	23	1
G	203	6
<b>Celkem</b>	<b>3385</b>	<b>100</b>

Zdroj: LIS Synlab; vlastní zpracování

**Graf 2: Procentuální zastoupení**



Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře Synlab v Českých Budějovicích; vlastní zpracování

### 5.3 Závislost výskytu beta-hemolytických streptokoků na ročním období

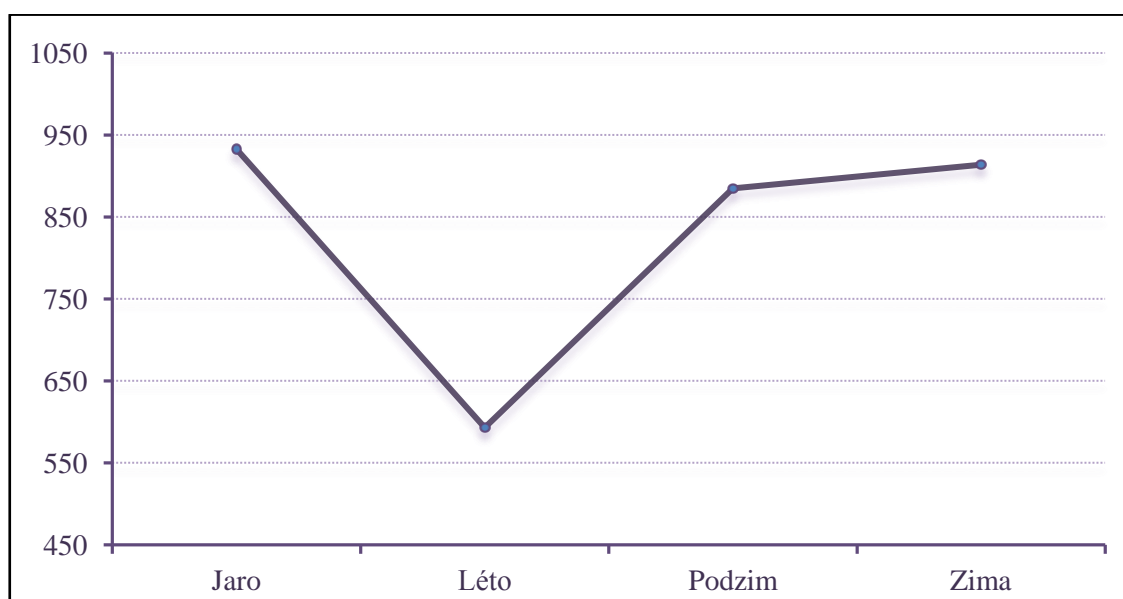
Graf 3 je znázorněním závislosti výskytu beta-hemolytických streptokoků na ročním období. Data vycházejí z hodnot v tabulce 3. Absolutní počty jsem vytvořila sečtením všech hodnot z jarních (duben, květen, červen), letních (červenec, srpen, září), podzimních (říjen, listopad, prosinec) a zimních měsíců (leden, únor, březen).

**Tabulka 3: Celkový počet beta-hemolytických streptokoků za jednotlivá období**

Období	Absolutní počet
Jaro	933
Léto	593
Podzim	885
Zima	914

Zdroj: LIS Synlab; vlastní zpracování

**Graf 3: Závislost výskytu beta-hemolytických streptokoků na ročním období**



Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře Synlab v Českých Budějovicích; vlastní zpracování



## 6. Diskuse

V kapitole výsledky jsem graficky zpracovala informace o počtu jednotlivých druhů beta-hemolytických streptokoků za rok 2013. Hodnoty jsem získala z informačního systému LIS v mikrobiologické laboratoři Synlab České Budějovice. Klíčovým materiálem zde byl výtěr z krku.

Cílem mé bakalářské práce je odlišení *Streptococcus pyogenes* od ostatních beta-hemolytických streptokoků. *Streptococcus pyogenes* se vyznačuje malými šedavými koloniemi s výraznou hemolýzou a oko zkušeného mikrobiologa jej většinou na první pohled rozezná od ostatních druhů, ale o správnosti diagnózy je třeba se přesvědčit pomocí latexové aglutinace, případně za požití MALDI Biotyper, který funguje na principu hmotnostní spektrometrie.

Odlišení *Streptococcus pyogenes* od ostatních typů beta-hemolyzujících streptokoků je důležité, kvůli jeho vysoké patogenitě. Je hlavní příčinou bakteriálních tonzilitid a jeho přítomnost může vést i ke vzniku komplikací, hlavně u osob s neléčenou infekcí, nebo také při nedostatečné léčbě.

Ostatní typy beta-hemolytických streptokoky mají podobné následky, jen *Streptococcus agalacticae* je řešen spíše v souvislosti s těhotnými ženami a novorozenci.

Při zpracování výsledků získaných výzkumnou činností jsem vycházela ze stanovených hypotéz, podle nichž jsem vytvářela grafy a tabulky:

H1: Výskyt beta-hemolytických streptokoků je během roku rovnoměrný (stejný).

H2: *Streptococcus pyogenes* převažuje nad ostatními typy beta-hemolytických streptokoků.

Jako základ pro zpracování výsledků výzkumu jsem vytvořila shrnující tabulku (Tab. 1), z které jsem vycházela při tvorbě grafů a příslušných tabulek. Pokračovala jsem vytvořením grafu (Graf 1), jenž shrnuje hodnoty o počtu jednotlivých typů beta-hemolytických streptokoků v jednotlivých měsících, k tomuto znázornění jsem využila skládaný sloupcový graf. Díky tomuto schématu mohu získat odpověď na první hypotézu, která říká, že výskyt beta-hemolytických streptokoků je ve všech obdobích roku shodný. Dle grafu hodnot, ale tuto hypotézu musíme zamítnout, jelikož je z něj

jasně patrné, že v určitých obdobích roku je výskyt těchto streptokoků výrazně nižší, konkrétně v letních měsících (červenec, srpen, září), poté se jejich počet postupně zvyšuje, nejspíše vlivem chladnějšího počasí.

Z téhož schématu si můžu vyvodit odpověď i na druhou hypotézu, jelikož k jejich znázornění jsem využila sloupcový graf skládaný. Ten jasně potvrzuje druhou hypotézu, protože ve všech zaznamenaných obdobích, počet *Streptococcus pyogenes* výrazně převyšuje jiné typy. Ještě lépe jsem si odpověď na tuto hypotézu vyvodila z grafu č. 2, který ukazuje procentuální zastoupení jednotlivých beta-hemolytických streptokoků za rok 2013. Kdybych chtěla být konkrétnější, tak typ A, tedy *Streptococcus pyogenes*, zaujímá 85% celkového počtu diagnostikovaných beta-hemolytických streptokoků, typ C a G po 6% celkového počtu případů, typ B je zachycen ve 2 %, jelikož mnohem častěji se nalézá v urogenitálním traktu žen, a typ F tvoří jen 1% z celkové hodnoty.

S odkazem na první hypotézu, kterou jsem vyvrátila pomocí grafu 1, jsem chtěla vytvořit schéma, které vystihne pokles, nebo naopak růst počtu beta-hemolytických streptokoků v závislosti na ročním období. K tomuto účelu jsem využila spojnicového grafu (Graf 3), jehož křivka jasně ukazuje výrazný pokles v letních měsících (červenec, srpen, září) a postupný nárůst s nastupujícím podzimem (říjen, listopad, prosinec), který přetrvává až do jara (duben, květen červen), kdy začíná opět klesat.

Jakékoliv porovnání výsledků, které jsem získala z informačního systému LIS laboratoře Synlab České Budějovice, je poněkud obtížné, protože výzkum zabývající se výskytem beta-hemolytických streptokoků neexistuje. Většina studií je zaměřena na surveillanci invazivních onemocnění vyvolaných *Streptococcus pneumoniae*. Tyto studie v naší republice zajišťuje *Národní referenční laboratoř pro streptokokové nákazy*, která spadá pod *Státní zdravotní ústav*, ta může, v případě potřeby, zajistit surveivallenci onemocnění vyvolaných *S. pyogenes* a *S. agalacticae* vyvolávající novorozenecké choroby (36).

V zahraničí je výzkum zaměřen podobným směrem. Přesněji se zabývají záchytem invazivních chorob a úmrtí způsobených *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* a *S. agalacticae* (8).

Rozhodla jsem se tedy porovnat zpracované hodnoty z roku 2013 s výsledky za rok 2012, získané v téže laboratoři. Vytvořila jsem tabulky a grafy podobně jako u roku 2013 a srovnávala.

Ze zpracovaných dat za rok 2012 bych mohla vyvrátit domněnku o rovnoměrném výskytu beta-hemolytických streptokoků (viz příloha 7) a potvrdit převažující výskyt *S. pyogenes* nad ostatními typy (viz příloha 8), stejně jako v roce 2013. Dokonce i procentuální zastoupení je velmi podobné. V roce 2012 procentuální zastoupení *S. pyogenes* činilo 83% a v roce 2013 85%, výskyt typu B a F je totožný, a u typu C a G se objevuje mírná výchylka, typ C je v roce 2012 zachycen v 9 % případů a typ G jen v 5 %.

Porovnání závislosti výskytu těchto streptokoků na ročním období, v obou srovnávaných letech, je ve výsledku skórem totožné. Jediná výchylka je v celkovém počtu případů, kterých je v roce 2013 o 2% méně než v roce 2012.

V závěru bych chtěla nastínit potřebu studií zaměřujících se na výskyt jednotlivých druhů beta-hemolytických streptokoků, což by mohlo prospět v prevenci nálezů způsobených těmito streptokoky.

## 7. Závěr

Do bakalářské práce jsem zahrнула celkový postup při laboratorní diagnostice beta-hemolytických streptokoků, využívaný v běžné praxi, a zhodnotila množství těchto streptokoků za rok 2013, které byly určeny v mikrobiologické laboratoři Synlab České Budějovice.

Výsledkem mého výzkumu bylo zjištění, že naprostá většina analyzovaných vzorků obsahovala bakterii *S. pyogenes*, která je hlavní příčinou bakteriálních tonzilitid. Avšak nejzávažnějším důsledkem onemocnění jsou sekundární komplikace způsobené neléčenou infekcí. Ty se dříve projevovaly jako nedomykavost chlopní a třesy hlavy. S nástupem penicilinu se však jejich výskyt rapidně snížil a proto by bylo prospěšné, vytvořit výzkum zaměřený na beta-hemolytické streptokoky. Ten by probíhal jako sentinelová studie v rámci vybraných pracovišť po celé republice. Sbíraná data by mohla přispět k vytvoření opatření zaměřených na osvětu běžného obyvatelstva, jelikož mnoho lidí netuší, co jim neléčená infekce může způsobit (36).

## 8. Seznam informačních zdrojů

1. ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. ROFF, K. ROBERTS and P. WALTER. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2009, 65-66. ISBN 0-8153-3218-1
2. MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO, P. V. DUMLAP and D. P. CLARK. *Biology of microorganism*. 20. ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2009, 3-9, 966- 969. ISBN 0-321-53615-0
3. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie*. Praha: Grada, 2010. s. 69-74. ISBN 978-80-247-3170-4
4. GÖPFERTO VÁ, D., D. JANO VSKÁ, K. DOHNAL a V. MELICHERČÍKOVÁ. *Mikrobiologie, Imunologie, Epidemiologie, Hygiena*. 3. doplněné vydání. Praha: Triton, 2002, s. 23-30, 101-102. ISBN 80-7254-223-0
5. ROZSYPAL, Stanislav et al. *Obecná bakteriologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981, s. 56-75.
6. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005, s. 40-47. ISBN 80-86850-00-5
7. BEDNÁŘ, M., V. FRAŇKOVÁ, J. SCHINDLER, A. SOUČEK a J. VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1996. s. 35-62, 204-210.
8. VERSALOVIC, J., K. C. CARRALL, G. FUNKE, J. H. JARGENSEN, M. L. LANDRY and D. W. WARNOCK. *Manual of clinical microbiology*. 10. ed. Washington DC: ASM Press, 2011, 331-349. ISBN 978-1-55581-463-2

9. VOTAVA, Miroslav et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, dotisk 2006, s. 110-118. ISBN 80-902896-6-5
10. BEDNÁŘ, M., A. SOUČEK, J. VÁVRA. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton, 1994, s. 28-37. ISBN 80-901521-4-7
11. MAIVALDOVÁ, Iva. *Kyselina hyaluronová a možnosti jejího využití* [online]. Brno, 2008 [cit. 2014-03-06]. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/xmlui/bitstream/handle/11012/1214/bakal%C3%A1%C5%99sk%C3%A1%20pr%C3%A1ce.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
12. PAUL, Siba Prosad and Susie JERWOOD. Group A streptococcal septocemia, meningitis and cerebral Access: case report and literature review. *The Turkish Journal of Pediatrics* [online]. 2012 [cit. 2014-03-06], 54, 180-183. ISSN 0041-4301. Dostupné z: <http://www.turkishjournalpediatrics.org/?fullTextId=1045&lang=eng>
13. KOSINA, P., S. PLÍŠEK, V. DOSTÁL, M. MORÁVKOVÁ, P. ČERMÁK, J. PREIS, A. LUKEŠ, R. KRAČMAROVÁ a J. KRAUSOVÁ. Invazivní streptokokové infekce. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2007, 13(6), 220-224. ISSN 1211-264X
14. TAMINATO, M., D. FRAM, M. R. TORLONI, A. G. S. BELASCO, H. SACONATO, D. A. BARBOSA. Screening for group B Streptococcus in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* [online]. 2011, 19(6), 1470-1478 [cit. 2014-03-07]. ISSN 1518-8345. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-11692011000600026&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692011000600026&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

15. FUČÍKOVÁ, Terezie. *Klinická imunologie v praxi*. Druhé, přepracované vydání. Praha: Galén, ©1995, 1997, s. 100-106. ISBN 80-85824-57-4
16. FÖLSH, U. R., K. KOCHSIEK a R. F. SCHMIDT et al. *Patologická fyziologie*. Vydání 1. Praha: Grada, 2003, s. 433. ISBN 80-247-0319-X
17. MAREK, Josef et al. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 3., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2005, s. 112-114. ISBN 80-247-0839-6
18. VÁCHA, Jiří. *Patologická fyziologie III*. První vydání. Brno: Masarykova universita, 1994, s. 159. ISBN 80-210-0979-9
19. MEGGED, O., M. ASSOUS, G. WEINBERG, Y. SCHLESINGER. Inducible Clindamycin Resistance in Beta-Hemolytic Streptococci and Streptococcus pneumoniae. *Israel Medical Association Journal* [online]. 2013, 15, 27-30 [cit. 2014-03-09]. Dostupné z:  
<http://www.ima.org.il/IMAJ/ViewArticle.aspx?year=2013&month=01&page=27>
20. BEČVÁŘOVÁ, Jarmila. *Laboratorní příručka: laboratoř České Budějovice U Tří Lvů 4*. České Budějovice [online]. České Budějovice, 2011 [cit. 2014-03-14]. Dostupné z: <http://synlab.cz/3870.html>
21. RACEK, Jaroslav et al. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, ©1999, s. 23. ISBN 80-7262-023-1
22. JANATOVÁ, Jana. *Laboratorní příručka: laboratoř Chomutov, Libušina ulice 3240/4* [online]. Chomutov, 2014 [cit. 2014-03-14]. Dostupné z: [http://synlab.cz/fileadmin/standortseiten/synlab\\_cz/LP/LP\\_samotne/VD\\_Ch\\_02\\_Laboratorni\\_prirucka.pdf](http://synlab.cz/fileadmin/standortseiten/synlab_cz/LP/LP_samotne/VD_Ch_02_Laboratorni_prirucka.pdf) - jak odebírat z krku

23. Synlab czech s.r.o. Před odběrem. *Synlab*. Česká Republika, ©2013 [2014-03-14] Dostupné z: <http://www.synlab.cz/4307.html>
24. Med-lab trade, s.r.o. Transportní odběrové soupravy pro mikrobiologii: s mediem. *Medlab* [online]. 2008 [cit. 2014-03-15]. Dostupné z: [http://www.medlab.cz/s\\_mediem.htm](http://www.medlab.cz/s_mediem.htm)
25. CHMELÁŘ, D. a E. BAZGEROVÁ. Kultivační média pro kultivaci anaerobních bakterií. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2009, 15, 205-209.
26. VOTAVA, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 1. vydání. Brno: Hartus, 2000, s. 161-162. ISBN 80-238-5058-X
27. POTUŽNÍK, V., R. RISSFRODT a J. SZITA. *Bakteriologische Nährmedien*. Jena: Gustav Fischer Verlag Jena, 1987, 137. ISBN 3-334-00111-3
28. Biomérieux. Blood Agar culture media: Columbia CNA agar + 5% sheep blood. *Biomerieux-culturemedia* [online]. ©2013 [cit. 2014-03-17]. Dostupné z: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/32-columbia-cna-agar-+-5-percent-sheep-blood>
29. Biomérieux. Blood Agar culture media: columbia agar + 5% horse blood. *Biomerieux-culturemedia* [online]. ©2013 [cit. 2014-03-17]. Dostupné z: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/29-columbia-agar-+-5-percent-horse-blood>
30. TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. PYRstrip. *Testlinecd*. ©2009-2014 [cit. 2014-03-18]. Dostupné z: <http://www.testlinecd.cz/pyrstrip>



31. DiaMondiaL. *DiaMondial strep kit*. 2013.
32. Bruker s.r.o. MALDI Biotyper: Systém pro mikrobiální identifikace příští generace 21. století. *Bruker-sro* [online]. ©2013 [cit. 2014-03-22]. Dostupné z: <http://www.bruker-sro.cz/maldi-biotyper>
33. Bruker s.r.o. *MALDI Biotyper: Návod. Kalibrace MALDI Biotyper*. 2011
34. Bruker s.r.o. Brochure: MALDI Biotyper. *Bruker-sro* [online]. 2011 [cit. 2014-03-22]. Dostupné z: <http://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper/learn-more.html>
35. Bruker s.r.o. *MALDI Biotyper: Návod. Standardní operační postup pro čištění MALDI destiček*. 2011
36. Státní zdravotní ústav. Národní referenční laboratoř pro streptokokové nákazy. *Szu* [online]. 25. červen 2012 [cit. 2014-04-08] Dostupné z: <http://www.szu.cz/narodni-referencni-laborator-pro-streptokokove-nakazy>

## **9. Klíčová slova**

Streptokoky

Beta-hemolytické streptokoky

*Streptococcus pyogenes*

Latexová aglutinace

PYR-test

MALDI Biotyper

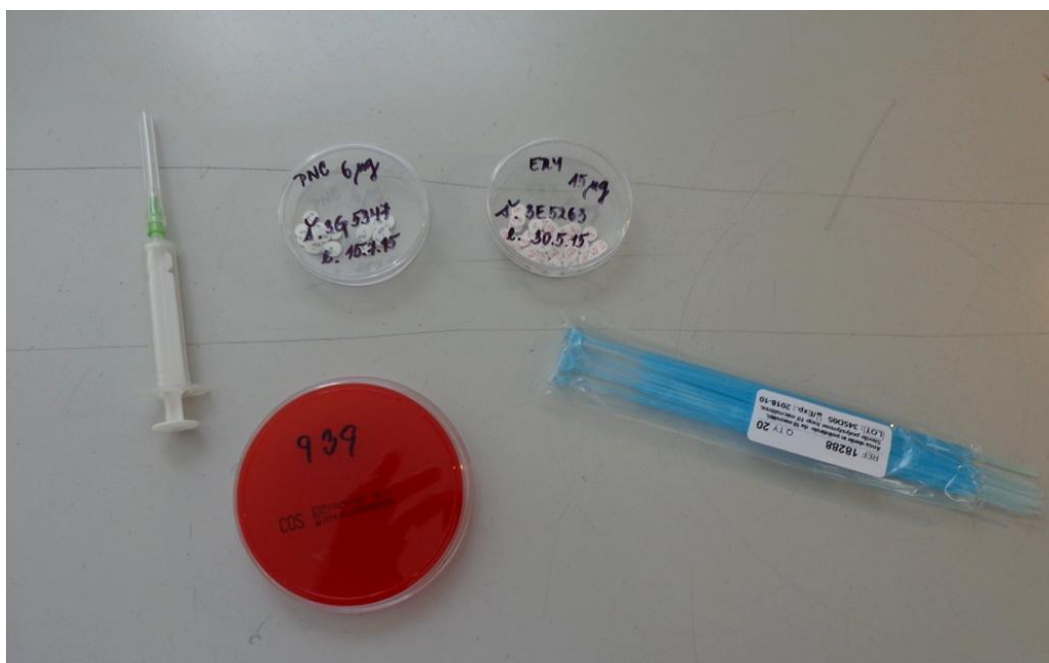
## 10. Přílohy

### Příloha 1: Odběrové tampóny



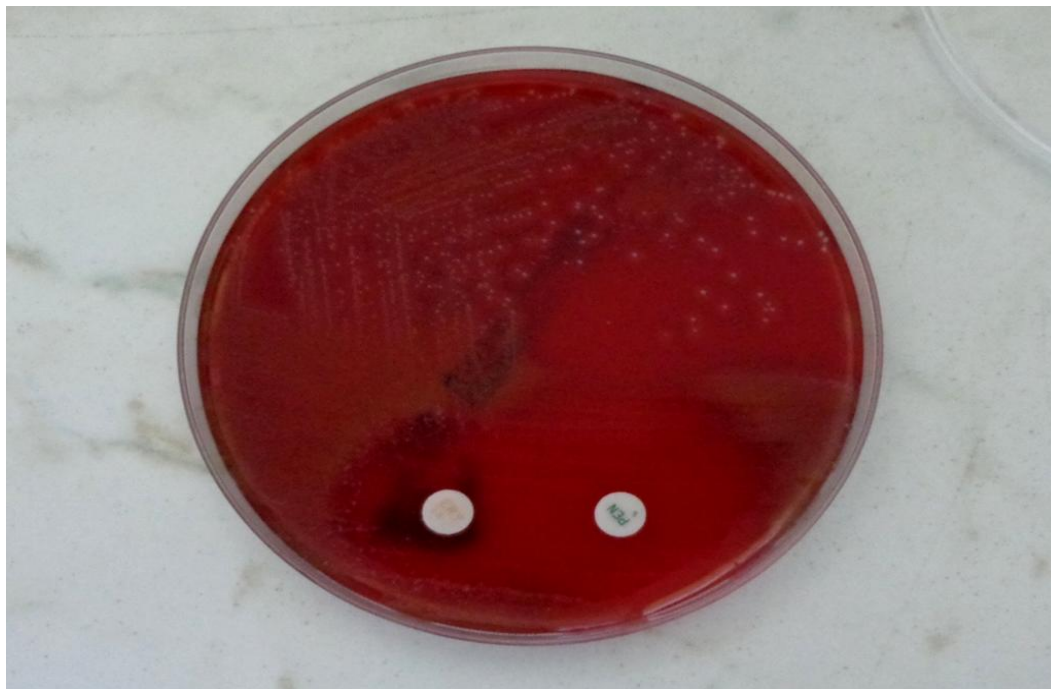
Zdroj: Vlastní fotografie

### Příloha 2: Potřeby pro rozočkování



Zdroj: Vlastní fotografie

### Příloha 3: Plotna s beta-hemolytickým streptokokem



Zdroj: Vlastní fotografie

### Příloha 4: PYRstrip s reakčním činidlem



Zdroj: Vlastní fotografie

### Příloha 5: Extrakční roztoky k latexové aglutinaci



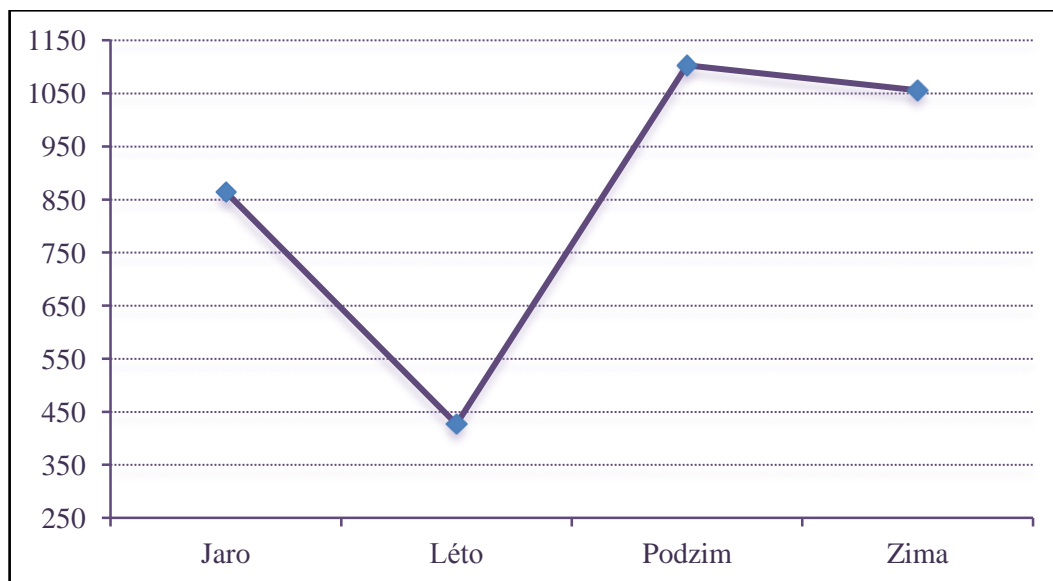
Zdroj: Vlastní fotografie

### Příloha 6: Latexové partikule



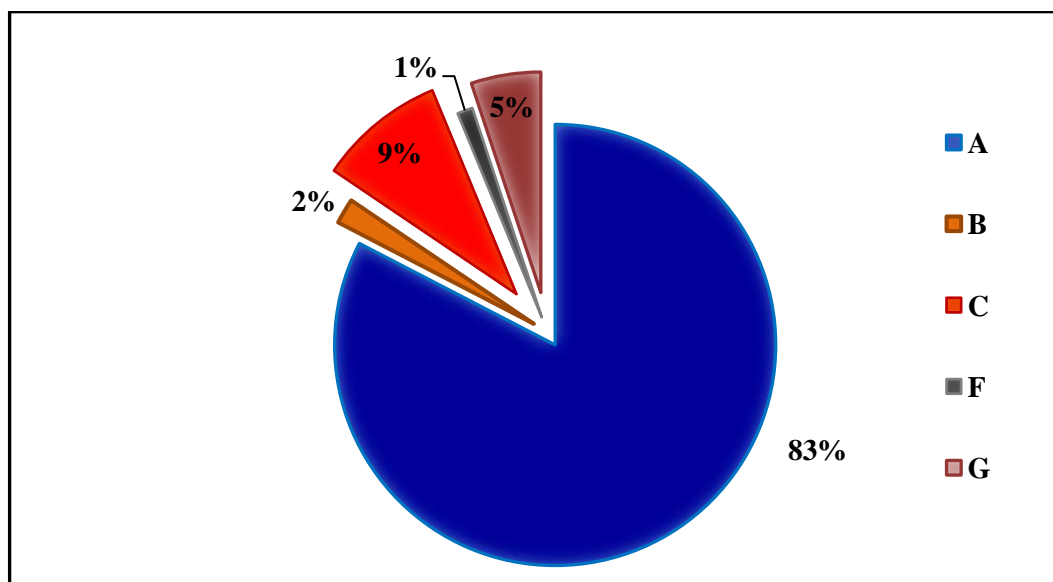
Zdroj: Vlastní fotografie

### Příloha 7: Výskyt beta-hemolytických streptokoků v roce 2012



Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře Synlab v Českých Budějovicích; vlastní zpracování

### Příloha 8: Zastoupení beta-hemolytických streptokoků v roce 2012



Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře Synlab v Českých Budějovicích; vlastní zpracování