

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



Bakalářská práce

**Streptokoky skupiny anginosus (SAG) -
analýza dat spojených s pozitivními nálezy**

Lenka Brieslingerová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Barbora Voxová

Konzultant: MUDr. Vladislav Raclavský, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí této bakalářské práce paní PharmDr. Barboře Voxové za odborné vedení práce a cenné připomínky.

Dále bych chtěla poděkovat panu MUDr. Vladislavovi Raclavskému Ph.D. z FN Olomouc za jeho ochotu a čas, který mi věnoval a také za poskytnutí datových údajů k praktické části této práce.

V neposlední řadě patří mé poděkování přátelům a rodině za podporu během celého mého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

1. ABSTRAKT

Lenka Brieslingerová

Streptokoky skupiny anginosus (SAG) – analýza dat spojených s pozitivními nálezy

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotní laborant

Cíl: Cílem práce je shrnutí dosavadních poznatků o skupině streptokoků *anginosus* a zpracování datových údajů, týkajících se pacientů, u kterých byl zaznamenán pozitivní nález těchto streptokoků ve vzorku. Data byla poskytnuta mikrobiologickou laboratoří FN Olomouc.

Metody: Grafické zpracování datových údajů o pacientech s pozitivním nálezem SAG.

Výsledky: Průměrný věk pacientů, u nichž byly identifikovány bakterie SAG, byl 50,2 let. Výskyt byl častější u mužů než u žen. Nejvíce zastoupeným druhem v této práci byl *S. agninosus* (53%), následoval *S.constellatus* (34%) a nejméně se objevoval *S. intermedius* (13%). Vzorek pocházel nejčastěji z infekčního ložiska, dalšími hojně zastoupenými místy odběru byly urogenitál a dýchací cesty. Každý z druhů je asociován s jiným typem infekce. *S. anginosus* byl hlavní patogen u infekcí urogenitálního systému a také u intraabdominálních infekcí. *S. constellatus* se podílel především na infekcích dýchacích cest, nejčteněji se vyskytoval také v hemokultuře. *S. intermedius* bývá obvykle nalezen u abscesů, v této studii byl nalezen i jeho poměrně vysoký výskyt v hemokultuře (15%). *S. anginosus* a *S. constellatus* mají vrchol výskytu na jaře, zatímco *S. intermedius* je nejfrekventovanější v letních měsících.

Závěry: Nejohroženější skupinou pacientů, kterou napadají SAG, jsou muži ve středním věku. Druh *S. anginosus* bývá nejvíce zastoupený, nejméně se objevuje *S. intermedius*. Každý z druhů má tendenci způsobovat různé infekce. Zatímco *S. anginosus* se nejhojněji objevuje u infekcí urogenitálního systému, *S. constellatus* je nejčteněji zastoupený u infekcí dýchacích cest a *S. intermedius* u abscesů.

Klíčová slova: Streptokoky skupiny *anginosus* (SAG), *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, abscesy, respirační onemocnění, bakteriémie, zpracování dat

2. ABSTRACT

Lenka Brieslingerová

Streptococci of the anginosus group (SAG) - analysis of data associated with positive findings

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové

Medical laboratory technician

Aim: The aim of the work is to summarize the current knowledge about the group of streptococci *anginosus* and the processing of data concerning patients with a positive finding of these streptococci in the sample. The data was provided by the microbiological laboratory of FN Olomouc.

Methods: Graphical processing of data on patients with positive SAG findings.

Results: The mean age of patients identified with SAG was 50.2 years. Occurrence was more common in males than females. The most represented species in this work was *S. anginosus* (34%), followed by *S. constellatus* (34%), and *S. intermedius* (13%). The sample was most often derived from an infectious deposit, other abundant collection sites were the urogenital and respiratory tract. Each species is associated with a different type of infection. *S. anginosus* was the major pathogen in urogenital system infections as well as in intraabdominal infections. *S. constellatus* was involved primarily in respiratory infections, most commonly in haemocultures. *S. intermedius* is usually found in abscesses and in this study, its relatively high incidence in haemocultures (15%) was also found. *S. anginosus* and *S. constellatus* have the peak occurrence in spring, while *S. intermedius* is the most frequented in the summer months.

Conclusions: The most endangered group of patients attacked by SAG are middle-aged men. The species *S. anginosus* is the most represented, the least occurring is *S. intermedius*. Each species tends to cause various infections. While *S. anginosus* appears most abundant in urogenital system infections, *S. constellatus* is the most common in respiratory infections and *S. intermedius* in abscesses.

Key words: Streptococcus *anginosus* group (SAG), *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, abscesses, respiratory diseases, bacteraemia, data processing

Obsah

1. ABSTRAKT	4
2. ABSTRACT	5
3. ÚVOD	8
4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	9
5. TEORETICKÁ ČÁST	10
5.1 Stručná charakteristika SAG	10
5.1.1 Rod <i>Streptococcus</i>	10
5.1.2 <i>Streptococcus anginosus</i> group (SAG)	11
5.1.3 Klasifikace SAG	12
5.1.4 Klinický význam	12
5.1.5 Faktory virulence	12
5.2 Možnosti detekce a identifikace SAG v klinickém vzorku	16
5.2.1 Kultivace	16
5.2.2 Gramovo barvení	18
5.2.3 Hemolýza	19
5.2.4 Latexová aglutinace	19
5.2.5 Biochemická identifikace	20
5.2.6 Molekulárně-biologická identifikace	26
5.2.7 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie	28
5.3 SAG jako tradiční patogeny hnisavých procesů	30
5.3.1 Mozkové abscesy	30
5.3.2 Jaterní abscesy	31
5.3.3 Respirační infekce	32
5.3.4 Ostatní infekce	33
5.4 SAG jako emergentní patogeny	35
5.4.1 Cystická fibróza	35
5.4.2 Chronická obstrukční plicní nemoc (COPD)	36
6. VÝSLEDKY	37
6.1 Lokalita odběru a frekvence nejvíce zastoupených diagnóz	37

6.2	Závislost výskytu jednotlivých druhů SAG v daných lokalitách na vzniku infekce	40
6.3	Kolísání výskytu sledovaných druhů SAG v různých měsících.....	46
6.4	Pohlaví a průměrný věk pacientů, u kterých byly zaznamenány bakterie SAG	48
7.	DISKUSE	50
8.	ZÁVĚR	52
9.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	53
10.	SEZNAM TABULEK	55
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ	55
12.	SEZNAM GRAFŮ.....	56
13.	POUŽITÁ LITERATURA.....	57

3. ÚVOD

Skupina streptokoků *anginosus* (SAG), dříve známá jako *milleri*, zahrnuje tři druhy, a to *Streptococcus anginosus*, *S. constellatus* a *S. intermedius*. Jako jejich charakteristické vlastnosti se často uvádějí vůně po karamelu a velikost kolonií okolo 0,5 mm. U 15-30% lidské populace se běžně vyskytují na sliznicích v dutině ústní, hrdle, gastrointestinálním traktu a v urogenitálním traktu žen. Je ale hlášeno stále více případů, kdy tato skupina bakterií způsobuje závažné infekce, především abscesy jater a mozku. Souvislost byla také prokázána u exacerbací plicních onemocnění, jako jsou cystická fibróza a chronická obstrukční plicní nemoc.

Každý druh je spojen s infekcemi na jiných místech. *S. anginosus* je častým původcem bakteriémie a bakteriální endokarditidy. *S. intermedius* je hlavním patogenem abscesů jater a mozku a *S. constellatus* je obvykle izolován ze vzorků u infekcí dýchacích cest.

K šíření těchto bakterií dochází třemi možnými způsoby. Buď dochází k přímému přestupu bakterií z přilehlé infekční oblasti, nebo se hematogenní cestou bakterie šíří ze vzdáleného infekčního ložiska. Poslední možnost je infikování pacienta po chirurgickém zákroku či traumatu.

V minulosti tyto bakterie nebyly považovány za významné patogeny vzhledem k jejich komenzální povaze. Jejich diagnostika je také obtížná díky různorodým hemolytickým, antigenním a biochemickým vlastnostem. S rozvojem semi-selektivních kultivačních médií, molekulárně biologických metod a MALDI-TOF MS pro rutinní identifikaci mikroorganismů se zvýšil počet případů, kdy byly SAG prokázány jako původci infekcí.

4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

První část mé práce je zaměřená na shrnutí dosavadních poznatků o skupině streptokoků *anginosus*. Práce popisuje charakteristické vlastnosti této skupiny, možnosti jejich identifikace a také infekce, se kterými jsou nejčastěji spjaty.

Druhá část práce se zabývá analýzou dat výskytu streptokoků skupiny *anginosus*, které byly získány z mikrobiologické laboratoře ve FN Olomouc. Cílem je zjistit, z jaké lokality vzorky nejčastěji pocházejí, dále je-li výskyt infekcí ovlivněn věkem a pohlavím pacienta, jaké typy infekcí jednotlivé druhy převážně způsobují a pořadí četnosti výskytu daných druhů. Zajímavé by bylo také zjištění, zda mají tyto bakterie sezónní výskyt.

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Stručná charakteristika SAG

Streptococcus anginosus group (SAG) patří do rodu *Streptococcus* a jako většina streptokoků mohou být součástí normální lidské mikroflóry. V této kapitole budou popsány základní charakteristiky této skupiny, především jejich klasifikace a faktory virulence, které jim umožňují pronikat do tkání a způsobovat závažné infekce.

5.1.1 Rod *Streptococcus*

Mezi streptokoky řadíme bakterie osídlující běžně sliznice a kůži, ale také druhy způsobující závažné infekce. Mezi nejčastější patogeny tohoto rodu patří především druhy *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* a *Streptococcus agalactiae*. Jsou to fakultativně anaerobní bakterie, uspořádané většinou ve formě různě dlouhých řetízků. Barví se dle Grama pozitivně a jsou kataláza i oxidáza negativní. Produktem metabolismu glukózy je kyselina mléčná.

Streptokoky můžeme klasifikovat podle hemolytických vlastností na krevním agaru. Hemolýza je způsobena produkcí hemolysinů bakteriemi. Hemoliziny rozrušují některou ze složek buněčné membrány a dochází k lýze erytrocytů. Rozeznáváme α , β , a γ hemolytickou reakci streptokoků. Viridace, neboli α -hemolýza je označení pro tzv. neúplnou hemolýzu, kdy dochází k rozrušení hemoglobinu, které se projevuje zezelenáním půdy v okolí kolonií. Tato reakce je způsobena redukcí hemoglobinu na verdoglobin pomocí peroxidu vodíku. β -hemolýza způsobuje úplnou lýzu erytrocytů doprovázenou odbarvením agaru. Při hemolýze γ k lýze erytrocytů nedochází.

Další klasifikace je založena na rozdílném složení stěnového polysacharidu C, podle kterého dělíme streptokoky dle Lancefieldové do antigenických skupin A až Z. Tyto povrchové antigeny se vyskytují u β -hemolytických a některých viridujících streptokoků a prokazují se serologickými reakcemi.[1][2]

Tabulka 1 Vybrané druhy streptokoků a jejich vlastnosti

Druh	Skupina Lancefield	Typ hemolýzy	Nejčastější onemocnění
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	β	Tonzilitida, erysipel, impetigo, spála, sepse
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	β	Infekce novorozenců
<i>Streptococcus anginosus</i>	A, C, G, F	α , β , γ	Abscesy jater, mozku a plic, infekční endokarditida, bakteriémie
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	α	Pneumonie, meningitida, sepse
<i>Streptococcus mutans</i>	-	α	Zubní kaz

Zdroj: David Greenwood, Richard C. B. Slack, John F. Peutherer a kolektiv, Lékařská mikrobiologie 1999 (upraveno)

5.1.2 *Streptococcus anginosus* group (SAG)

Streptokoky skupiny *anginosus* jsou součástí mikroflóry u 15-30% lidské populace. Běžně je možná jejich izolace z různých míst zahrnujících dutinu ústní, hrdlo, gastrointestinální trakt a urogenitální trakt žen. Mají ale sklony způsobovat abscesy a systémové infekce. Mohou také napomáhat při exacerbaci plicních onemocnění, jako jsou chronická obstrukční plicní nemoc a cystická fibróza. Větší riziko rozvoje SAG infekcí bylo prokázáno u pacientů s diabetus mellitus, imunodeficiencí, maligním onemocněním a u pacientů po operacích. Roli může hrát i alkoholismus a kouření.[3]

Patří mezi Gram pozitivní mikroaerofilní bakterie a na krevním agaru je možné zaznamenat všechny druhy hemolýzy. Velikost kolonií se v průměru pohybuje okolo 0,5 mm. Často je popisována vůně po karamelu. Rostou pomalu, oxid uhličitý

podporuje jejich růst, některé kmeny dokonce vyžadují anaerobní podmínky. Citlivost byla prokázána na antibiotika penicilin, ampicilin, erytromycin a tetracyklin [4].

5.1.3 Klasifikace SAG

V minulosti nebyla taxonomie těchto streptokoků jednotná. Evropané a Japonci odborníci používali název *Streptococcus milleri* pro všechny druhy tohoto rodu, zatímco severoameričtí mikrobiologové využívali názvy *Streptococcus MG-intermedius* a *Streptococcus anginosus-constellatus*. Přestože se stále může objevovat pro popis tohoto rodu název *Streptococcus milleri*, za správné pojmenování považujeme termín *Streptococcus anginosus* group, které poprvé použil Kawamura v roce 1995 [5].

Nejnovější klasifikace SAG rozděluje tyto patogeny do tří druhů, od sebe rozlišitelných díky fenotypovým analýzám, DNA hybridizačním studiím a genetickým charakterizacím. Druhy *Streptococcus constellatus*, *S. anginosus* a *S. intermedius* obsahují pět poddruhů. U *S. constellatus* rozlišujeme tři poddruhy: *subspecies constellatus*, *subspecies pharyngis* a *subspecies viborgensis*. *Streptococcus anginosus* se dělí do dvou poddruhů nazývaných *subspecies whigy* a *subspecies anginosus*. Výše zmíněné tři druhy jsou řazeny do jedné skupiny na základě podobnosti 16S ribozomální RNA podjednotky [6][7].

5.1.4 Klinický význam

Každý z jednotlivých druhů SAG je často spojován s charakteristickým místem, z jakého byl izolován. *Streptococcus anginosus* bývá často prokázán ze vzorků z gastrointestinálního a z urogenitálního traktu a je spjat se vznikem infekční bakteriémie a bakteriální endokarditidy. Z SAG bývá *S. anginosus* také nejčastějším původcem vzniku zubních abscesů. *Streptococcus constellatus* je typický pro abscesy dýchacích cest, abdominální abscesy a infekce měkkých tkání. *S. intermedius* bývá nejčastěji prokazován z abscesů mozku a jater.[7][8]

5.1.5 Faktory virulence

Schopnost patogenů vyvolat onemocnění je ovlivněna přítomností faktorů virulence, které umožňují bakteriím pronikat do tkáně a odolávat imunitním reakcím hostitele. Ačkoli u SAG nebyly plně objasněny mechanismy působení všech těchto

faktorů, mezi nejdůležitější patří přítomnost bakteriálního pouzdra s povrchovými antigeny I/II, produkce β -hemolyzinů, sirovodíku a hydrolytických enzymů.

5.1.5.1 Bakteriální pouzdro

Roli v patogenezi hraje u většiny streptokoků mimo jiné i bakteriální pouzdro, jelikož bylo prokázáno, že opouzdřené bakterie jsou více patogenní než bakterie bez pouzdra. U SAG je pouzdro tvořeno polysacharidy a jeho přítomnost byla prokázána u všech třech druhů. Jeho funkce spočívá v ochraně bakterie před fagocytózou a protilátkovou odpovědí organismu. Inhibice fagocytózy je účinnější s nárůstem koncentrace polysacharidů v pouzdře [8][9].

5.1.5.2 Antigen I/II

Nedávno byl také u *S. intermedius* objeven antigen I/II. Jedná se o protein, umístěný na povrchu polysacharidového pouzdra. Váže lidský fibronectin a laminin, což jsou glykoproteiny umístěné na povrchu buněčných membrán. Fibronectin se navíc vyskytuje i v tělních tekutinách. Antigen I/II navozuje exkreci IL-8 z monocytů, a tím dochází k chemotaxi neutrofilů a jejich akumulaci v místě infekce. Následujícím nahromaděním prozánětlivých cytokinů dochází k poškození tkáně a pozdějšímu vzniku abscesu. [10]

5.1.5.3 β -hemolyziny

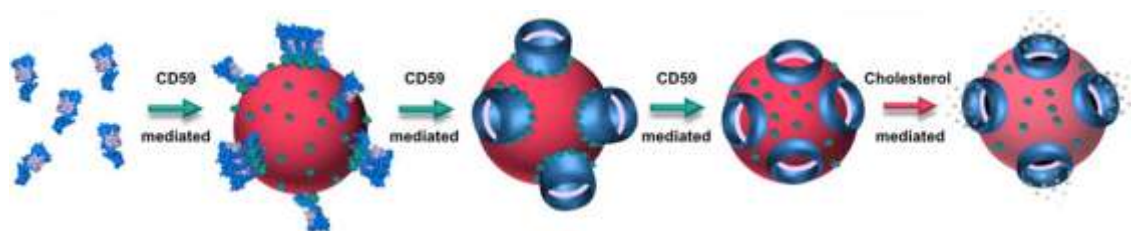
Hemolyziny jsou exotoxiny, odpovědné za schopnost bakterií lyzovat erythrocyty, v některých případech také leukocyty. U SAG byly dosud objeveny dva β -hemolyziny. Jako první z exotoxinů byl identifikován intermedilyzin (ILY) produkovaný druhem *S. intermedius*, později streptolyzin S druhů *S. anginosus* a *S. constellatus*.

Intermedilysin

Má specifickou schopnost lyzovat pouze lidské erythrocyty. Řadíme ho do skupiny cytolyzinů produkovaných gram-pozitivními bakteriemi a je velmi podobný pneumolyzinu *S. pneumoniae* a streptolyzinu O *S. pyogenes*. Tyto cytolyziny závislé na cholesterolu vytvářejí póry v membránách buněk, v jejichž důsledku dochází k jejich lýze. Liší se ale v mechanismu iniciace vzniku póru. Běžné cholesterol-dependentní cytolyziny se váží na membránový receptor složený z cholesterolu v buněčné

membráně. Intermedilysin využívá jako receptor povrchový znak CD59, normálně fungující jako ochranný receptor buněk proti vzniku MAC komplexu komplementu vazbou komplementových proteinů C8a a C9. V prvním kroku tedy dochází k navázání monomerních jednotek ILY na povrchový receptor CD59, kde dochází k jejich aktivaci a tvorbě dimerů. Následuje jejich oligomerizace a vznik tzv. prepóru. V této fázi prepóru je nutná přítomnost cholesterolu pro přeměnu v pór. Kromě lidských erytrocytů má ILY schopnost lyzovat neutrofile a tím sloužit jako tzv. únikový faktor *S. intermedius* před fagocytózou [11][12][13][14].

Obrázek 1 Lýza buněk pomocí intermedilysinu



Zdroj: Courtney M. Boyd, Edward S. Parson, Richard A. G. Smith, John M. Seddon, Oscar Ces, Dorven Bubeck (Disentangling the roles of cholesterol and CD59 in intermedilysin pore formation, 2016), převzato

Streptolysin S

Streptolysin S skupiny *S. anginosus* je odvozen od SLS *S. pyogenes*. Nedávno bylo zjištěno, že se nachází u β -hemolytických kmenů *S. anginosus* a *S. constellatus*. Tento exotoxin nelyzuje pouze lidské erytrocyty, ale je schopen rozpouštět i červené krvinky jiných savců. Byla provedena studie, která prokazuje lyzační schopnost i na erythrocytech kuřete. V porovnání se SLS *S. pyogenes* ale není schopen rozrušovat makrofágy a neutrofile [15].

5.1.5.4 Sirovodík

S. anginosus sekretuje enzym L-cystein-desulfhydrázu, který štěpí L-cystein na pyruvát, amoniak a sirovodík. Tento sirovodík je vysoce toxický pro savčí buňky. Jeho toxicita spočívá v tvorbě modifikovaných forem hemoglobinu např. sulfhemoglobinu a methemoglobinu, což vede k echinocytóze a následné hemolýze. Kromě hemolytických vlastností se na základě experimentálních pokusů předpokládá, že sirovodík zvyšuje permeabilitu tkání ústní sliznice, zvyšuje rozpustnost kolagenu, snižuje disulfidovou

vazbu v C3 složce komplementu a snižuje syntézu proteinů lidskými gingiválními fibroblasty. Tím přispívá k tvorbě onemocnění parodontu a abscesů [16][17].

5.1.5.5 Hydrolytické enzymy

SAG produkují velké množství extracelulárních enzymů přispívajících k jejich patogenitě rozrušením nukleových kyselin nebo složek extracelulární matrix. Mezi nejdůležitější patří hyaluronidáza, sialidáza (N – acetylneuraminidáza) a dále také nukleázy DNáza a RNáza, hrající roli při úniku bakterií z extracelulárních pastí neutrofilů.

Podle schopnosti produkovat sialidázu a hyaluronidázu je možné provést identifikaci SAG. *S. intermedius* jako jediný druh produkuje oba zmíněné enzymy, zatímco *S. constellatus* produkuje pouze hyaluronidázu, jejíž enzymová aktivita je ovšem nižší než u *S. intermedius*. U *S. anginosus* nebyla zaznamenána aktivita ani jednoho z výše uvedených enzymů [8].

Hyaluronidáza

Hyaluronidáza rozkládá kyselinu hyaluronovou (HA), která tvoří hlavní složku extracelulární matrix pojivové, epiteliální a nervové tkáně. HA je polysacharid s vysokou molekulární hmotností, tvořený střídavými zbytky N-acetylglukosaminu a glukuronové kyseliny spojenými glykosidickými vazbami. Podporuje proliferaci a migraci buněk během zánětů a zranění. Přítomnost HA ve sliznicích může hrát roli v mechanismu vzniku biofilmu tím, že slouží jako adhezní substrát a váže tak mikroorganismy k povrchu epitelu. Tvorba biofilmu je dynamický proces, který zahrnuje právě počáteční připojení buněk na povrch, tvorbu extracelulárních polymerů, zrání a disperzi jednotlivých buněk z biofilmu. Biofilm je obklopen polysacharidy, které organismy v biofilmu vylučují a tvoří tak polysacharidový obal, chránící bakterie před hostitelskou obranou a ATB.

Hlavním úkolem hyaluronidázy je poskytnutí bakteriálních živin enzymatickou depolymerací a rozkladem HA v pojivových tkáních. Tímto štěpením HA získávají bakterie energii a schopnost oddělit se od biofilmu a šířit se z počátečního místa infekce, což hraje významnou roli pro patogenitu tohoto organismu. [18]

Neuraminidáza

Povrchy sliznic mají na svém povrchu navázanou kyselinu sialovou, která je využívána jako substrát pro enzym sialidázu (N – acetylneuraminidáza). Kyselina sialová tvoří koncový sacharid glykanových řetězců mucinů a glykoproteinů buněčného povrchu. Jejím odštěpením sialidázou získává bakterie potřebné živiny ve formě sacharidů a dochází navíc ke snížení hustoty mucinu na povrchu sliznic. Po proniknutí hlenem se bakterie dostává k epiteliálnímu povrchu, kde enzymaticky štěpí výše uvedené glykoproteiny. Takto modifikovaný povrch hostitelských buněk umožňuje adhezi bakterií k odhaleným bakteriálním receptorům. Tímto mechanismem se patogeny šíří do hlubších tkání [19][20][21].

DNáza

Při bakteriálních infekcích se aktivuje nespecifická imunitní reakce zastoupená neutrofilů, které odpovídají na chemotaktické signály a přesouvají se tak do místa infekce. Neutrofilů ze svých granulí uvolňují do extracelulárního prostoru tzv. neutrofilní extracelulární pasti (NET), které mají fibrilární strukturu složenou z dekonenzované jaderné nebo mitochondriální DNA, přidružených histonů a proteinů. Hlavní funkce NET spočívá v zachycení a zabíjení okolních bakterií. DNáza exprimovaná bakteriemi rozpouští nukleové kyseliny obsažené v NET, tím omezuje imunitní funkci neutrofilů [22].

5.2 Možnosti detekce a identifikace SAG v klinickém vzorku

Identifikace SAG není vzhledem k obtížné kultivaci a také hemolytické a antigenní heterogenitě snadná. Rovněž jejich detekce na úrovni druhů je díky jejich nejednoznačným biochemickým vlastnostem ztížena. Nejpřesnější identifikaci nám poskytují genetické metody a MALDI-TOF MS.

5.2.1 Kultivace

Postup při primární kultivaci SAG se liší v závislosti na odebíraném materiálu a je neúčinnější v anaerobním prostředí. Vzorky krve odebíráme do speciálních tzv. hemokultivačních nádobek. Pro ostatní vzorky biologického materiálu jsou nejvhodnější semi-selektivní média McKay a NAS agar.

Pro získání čisté kultury jsou bakterie subkultivovány nejčastěji na krevním agaru, patřícím mezi nejvíce využívaná média ke kultivaci mikrobů. Tvoří ho agarový základ (pepton, glukóza, agar), který se při přípravě ochladí na 45 až 50 °C, poté se k němu přidá 5 až 10% sterilní defibrinované ovčí krve. K jeho přednostem patří také možnost pozorovat hemolytickou schopnost některých bakterií. Tato vlastnost je využívána při identifikaci některých bakterií, proto je někdy považován i za půdu diagnostickou [23].

5.2.1.1 Hemokultura

Kultivace krve patří mezi základní diagnostické postupy při septických stavech a jiných infekcích s přítomností bakterií v krevním řečišti. Odebírá se nesrážlivá žilní krev za přísně aseptických podmínek do speciálních nádobek, které mohou sloužit pro aerobní i anaerobní kultivaci. Existují i nádoby pro pediatrické účely, kdy je pro odběr nutné menší množství krve, optimálně kolem 4 ml. K odběru hemokultur se přistupuje při vzestupu tělesné teploty a nejlépe před zahájení terapie antibiotiky.

Obvykle se provádí 2-3 odběry z různých míst krevního řečiště v časových odstupech 20-30 minut. Pro první odběr je potřeba 16-20 mililitrů krve, která se rovnoměrně rozdělí do jedné aerobní a do jedné anaerobní nádoby. Při druhém odběru se většinou využívá pouze aerobní kultivační nádobka s potřebným objemem 8-10 ml krve.

Kultivace hemokultur se provádí v automatickém přístroji, který poskytuje optimální podmínky pro růst bakterií. Přístroj automaticky vyhodnocuje a signalizuje biochemické změny doprovázející růst bakterií. Pokud k růstu nedojde za určitý časový úsek (obvykle po jednom týdnu), hemokultura je hodnocena jako negativní. V případě pozitivního výsledku následuje rozočkování bakterie na krevní agar a Endovu půdu [23] [24].

5.2.1.2 Semi-selektivní agary

Kultivace na krevním agaru není vhodná pro primární záchyt SAG především z nesterilních vzorků, hlavně díky lehce zaměnitelnému vzhledu kolonií SAG s koloniemi bakterií běžně osídlujících sliznice a také menšímu kvantitativnímu zastoupení na agaru. Díky obtížnému rozlišení byly SAG v minulosti často přehlíženy a tím jejich léčba

ztížena. Za účelem podpory jejich růstu byla vyvinuta semi-selektivní pevná média McKay agar a NAS agar [25][26][27].

McKay agar

Je využíván nejčastěji při odběrech vzorků u pacientů s cystickou fibrózou. Obsahuje živnou půdu obohacenou o antibiotikum kolistin a kyselinu molinovou, které inhibují růst hlavních patogenů přítomných u cystické fibrózy *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Pro potlačení růstu ostatních viridujících streptokoků a pro selekci SAG se k půdě přidává sulfadiazin. Jako kalorimetrický pH indikátor slouží bromkrezolová červeň, která poskytuje barevný přechod z fialové na žlutou v přítomnosti bakterií vytvářejících kyselé prostředí. Přestože indikátor slouží především pro rozlišení SAG, není specifický, protože tuto vlastnost mají i některé další viridující streptokoky [25].

NAS agar

Jedná se o semi-selektivní agar s přidavkem kyseliny nalidixové a sulfamethazinu vhodný také pro kultivaci SAG ze vzorků z respiračního traktu. Poskytuje lepší podporu růstu SAG, protože McKay agar může být pro některé kmeny SAG příliš selektivní. NAS agar je tedy vhodnější pro primární kultivaci SAG, především pro druh *S. intermedius* [26][27].

5.2.2 Gramovo barvení

Umožňuje nám rozlišit gramnegativní bakterie od grampozitivních na základě rozdílného složení buněčné stěny. Pokud dochází k zabarvení bakterií do tmavomodra, označujeme tyto bakterie za grampozitivní. Pokud jsou po barvení růžové, jedná se o gramnegativní bakterie.

Grampozitivita bakterií je ovlivněna silnou vrstvou peptidoglykanu v buněčné stěně, která se při dehydrataci alkoholem smrskne a zpomalí tak vyplavování komplexu krystalové violeti s jodem. U gramnegativních bakterií hraje roli množství lipidů v buněčné stěně, kdy po působení alkoholu dochází k vytvoření pórů v lipidech a vyplavení barevných komplexů [23].

Postup:

1. Pomocí sterilní bakteriální kličky nabereme malé množství bakteriální suspenze a rozetřeme ji na podložní skličko.
2. Připravený vzorek necháme uschnout a fixujeme protažením v plameni.
3. Na vzorek kápneme krystalovou violet', která obarví preparát do modrofialova a necháme působit 20-30 s. Poté přebytečné barvivo slijeme.
4. Přelijeme Lugolovým roztokem (obsahuje jod) a necháme působit 20 s. Během této doby vznikne málo rozpustný komplex krystalové violeti s jodem.
5. Barvivo opláchneme etanolem nebo acetonem a následně vodou. Díky alkoholu dochází k narušení bakteriální stěny a možnému odbarvení preparátu.
6. Na vzorek kápneme roztok kontrastního barviva safraninu nebo karbofuchsinu a necháme přibližně 1 minutu působit.
7. Skličko opláchneme vodou a příp. vysušíme nad kahanem.
8. Obarvený preparát pozorujeme pod imerzí.

5.2.3 Hemolýza

Pro identifikaci hemolýzy streptokoků se používá selektivní Trypto-casein sojový agar s přídávkem 5% živočišné krve. Nejčastěji používané krvinky jsou ovčí, protože potlačují růst *Haemophilus haemolyticus*, který tvoří kolonie podobné streptokokům na agarech obohacených králičími, koňskými nebo lidskými krvinkami. Inkubujeme při teplotě 35°C v atmosféře obohacené o 5% CO₂ po dobu 24 hodin.

Přestože SAG vykazují všechny typy hemolýzy, výzkumy ukázaly, že při detekci hraje typ hemolýzy určitou roli. Nejčastěji β-hemolýzu projevuje *S. constellatus*, poté *S. anginosus* a u *S. intermedius* se β-hemolýza vyskytuje jen ojediněle.[7]

5.2.4 Latexová aglutinace

β-hemolytické streptokoky obsahují na svých membránách různé typy antigenů, které se podle svého rozdílného složení dělí podle Lancefieldové do skupin A až Z. Test latexové aglutinace poskytuje identifikaci základních streptokokových skupin A, B, C, D, F a G. Tyto antigeny jsou nejčastěji složeny z oligosacharidů na bázi rhamnosy s různými postranními řetězci, tvořenými převážně z glukosaminů. Výjimkou je antigen

D, který obsahuje kyselinu lipoteichoovou. Princip je založen na reakci specifického IgG vázaného na latexové částici s příslušným antigenem streptokokové stěny. Nejprve dochází k extrakci stěnového antigenu kyselinou dusitou při pokojové teplotě a následně k neutralizaci a vytvoření aglutinace během minutového časového intervalu v případě, že je test pozitivní.

Pro test je vhodné použít β -hemolytické streptokokové kolonie, které byly kultivovány na krevním agaru s přidavkem 5% ovčí krve po dobu 18-24 hodin. Standardní množství je 1-4 kolonie. U streptokoků skupiny F se doporučuje použít 10 i více kolonií [28].

SAG na svém povrchu mohou nést povrchové antigeny A, C, G, F, ale také nemusí mít žádný z nich. Nejvíce zastoupený povrchový antigen je antigen F [7].

5.2.5 Biochemická identifikace

Každá bakterie je charakteristická tvorbou pro ni specifických enzymů, sloužících pro získávání živin a materiálů pro výstavbu buněk. Princip biochemických testů je založen na dodání substrátu bakterii, která produkuje enzym schopný substrát přeměnit na produkt lišící se od substrátu skupenstvím nebo barvou, jejíž změnu je někdy nutno zvýraznit vhodným indikátorem. K rychlým testům, kdy známe výsledek během několika vteřin nebo minut, řadíme katalázový test a testy s diagnostickými proužky (PYR test, oxidázový test). Do skupin testů časově náročnějších zahrnujeme většinu zkumavkových testů a testů v plastových jamkách, kdy výsledek vyhodnocujeme nejdříve po několika hodinách, obvykle však do druhého dne a někdy až do dne třetího.

Pro SAG je typická produkce acetoinu z glukózy a fermentace laktózy, trehalózy, salicinu a sacharózy. Hydrolyzují esculin a arginin. Většina kmenů nefermentuje rafinózu, melibiózu a mannitol. Nehydrolyzují kyselinu hippurovou [23].

Tabulka 2 Základní biochemická identifikace odlišující SAG od ostatních viridujících streptokoků

Druh	Arginin	Esculin	VP	Mannitol	Sorbitol	Urea
<i>S. anginosus</i>	+	+	+	-	-	-
<i>S. constellatus</i>	+	+	+	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	+	+	+	-	-	-

Zdroj: Centers for disease control and prevention (Identification of Other Streptococcus Species: Streptococcus General Methods), 2006 (převzato)

5.2.5.1 Katalázový test

Patří mezi základní diagnostické testy pro odlišení kataláza negativních streptokoků a enterokoků od kataláza pozitivních stafylokoků. Test je založen na produkci enzymu katalázy, který štěpí peroxid vodíku na kyslík a vodu.

Peroxid vodíku (3%) kápneme na podložní sklíčko nebo do víčka misky, poté do kapky přeneseme pomocí sterilní bakteriální kličky bakteriální kolonii a rozmícháme. Pokud je test pozitivní dojde k produkci bublinek kyslíku [23].

5.2.5.2 Voges-Proskauer (VP) test

VP test můžeme považovat za klíčový pro identifikaci SAG. Na základě pozitivního výsledku je lze odlišit od ostatních β -hemolytických streptokoků. Dále nachází uplatnění v diferenciaci viridujících streptokoků.

Reakce probíhá ve zkumavce s VP médiem, které se naočkuje 1 kapkou suspenze bakterie a bujónu nebo pomocí sterilní očkovací kličky koloniemi z krevního agaru. Inkubujeme 24-48 hodin při teplotě 35 °C. Poté přeneseme 0,5 ml do skleněné zkumavky a přidáme dvanáct kapek alfa-naftolu a čtyři kapky 40% KOH. Zkumavku pozorujeme 30 minut, během kterých ji několikrát protřepeme. Identifikace je založena na schopnosti přeměny kyseliny pyrohroznové (glukózy) na acetyl-methylkarbinol (acetoin). V přítomnosti atmosférického kyslíku a 40% KOH se acetoin konvertuje na diacetyl. Působením alfa-naftolu a kreatininu na diacetyl vzniká při pozitivním výsledku růžovo-červený komplex, při negativním komplex žlutý [29].

5.2.5.3 Arginin test

Test je založen na hydrolýze aminokyseliny argininu v anaerobním prostředí, které může být zajištěno překrytím minerálním olejem. Reakce probíhá ve zkumavce s Moellerovým bujónem, který obsahuje arginin. Médium se naočkuje čistou bakteriální 24 hodinovou kulturou z krevního agaru nebo 1-3 kapkami suspenze z bujónu. Zkumavku necháme inkubovat při 35 °C až 7 dní. Jako pH indikátor reakce se používá bromkrezolová červeň. Při hydrolýze dochází ke zvýšení pH a změně barvy indikátoru ze žluté na fialovou. Pokud k hydrolýze nedochází, roztok zůstane zbarvený do žluta [29][30].

5.2.5.4 Eskulinový test

Eskulinový test je používán pro identifikaci kataláza-negativních bakterií. Test se provádí ve zkumavce se šikmým médiem obsahujícím eskulin. Médium se naočkuje čistou bakteriální 24 hodinovou kulturou z krevního agaru nebo 1-3 kapkami suspenze z bujónu. Zkumavku necháme inkubovat při 35 °C až 7 dní. Eskulin v médiu je hydrolyzován na dextrózu a eskuletin, který reaguje s chloridem železitým, nacházejícím se v médiu, za vzniku černohnědé barvy. Za pozitivní se test považuje, pokud zčerná více než polovina média ve zkumavce [30].

5.2.5.5 Komerční testy

Komerční testy jsou obvykle prováděny v mikrotitračních destičkách a umožňují provádění více biochemických testů najednou. Jsou dodávány od různých firem a mohou obsahovat různý počet zabudovaných substrátů.

Pro biochemickou identifikaci SAG se po základních testech (Gramovo barvení, katalázový test) často využívají testy Rapid ID 32 STREP od firmy BioMérieux nebo API 20 STREP od stejného dodavatele.

Existují i testy určené pouze pro SAG a jejich druhové rozlišení. Mezi takové testy řadíme FLUO-CARD MILLERI od firmy Key Scientific Product.

API 20 STREP test

Jedná se o test pro druhovou identifikaci streptokoků a enterokoků. Skládá se z testovacího proužku a obsahuje 20 mikrozkušavek, ve kterých jsou zabudovány dehydrované substráty, pomocí nichž zjišťujeme enzymatickou aktivitu bakterie nebo schopnost fermentace cukrů.

Enzymatické testy se naočkují suspenzí bakterie z čisté kultury a nechají se inkubovat. Výsledky hodnotíme na základě metabolických přeměn substrátů, které způsobí změny barev spontánně nebo po přidávku činidel. Testy na fermentaci cukrů se naočkují obohaceným médiem sloužícím pro rehydrataci substrátů. Fermentací sacharidů dochází po inkubaci ke změně pH, o kterém nás informuje pH indikátor. Výsledky vyhodnocujeme pomocí odečítací tabulky.

K identifikaci se využívají substráty v následujícím pořadí: pyruvát sodný (VP), kyselina hippurová (HIP), eskulin citrát železitý (ESC), β -naftylamid pyroglutamová kyselina (PYRA), 6-brom-2-naftyl- α -D-galaktopyranosid (α GAL), naftol ASBI-glukuronová kyselina (β -GUR), 2-naftyl- β -D-galaktopyranosid (β GAL), 2-naftylfosfát (PAL), L-leucin- β -naftylamid (LAP), L-arginin (ADH), D-ribóza (RIB), L-arabinóza (ARA), D-manitol (MAN), D-sorbitol (SOR), D-laktóza (LAC), D-trehalóza (TRE), inulin (INU), D-raffinóza (RAF), škrob (ADM) a glykogen (GLYG). Jako 21. test je zařazena identifikace typu hemolýzy (HEM). Pokud se jedná o β -hemolýzu, hodnotíme test jako pozitivní číslem 4. Číselnou hodnotu nula přiřazujeme hemolýzám α a γ .

Postup:

1. Vytvoříme suspenzi (2 ml) z izolované kolonie s API suspenzním médiem se zákalem >4 McFarlanda.
2. Suspenzi naplníme první polovinu testovacího proužku (VP až ADH) a to tak, že přidáme 100 μ l do všech testů od VP do LAP a u testu ADH vyplníme pouze zkumavku.
3. Zbytek suspenze (přibližně 0,5 ml) přeneseme do ampule s GP médiem a promícháme.
4. Takto připravenou suspenzi napipetujeme do druhé poloviny testovacího proužku (od RIB po GLYG). Plníme pouze zkumavku jako u testu ADH.

5. Testy ADH a GLYG převrstvíme minerálním olejem, tím dojde k vytvoření konvexního menisku.
6. Testovací proužek zakryjeme víkem a inkubujeme při teplotě $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ v anaerobních podmínkách po dobu 4 až 4,5 hodiny pro první čtení. Pokud je potřeba provést druhé čtení, inkubujeme 24 hodin.

Po čtyřhodinové inkubaci přidáme kapku VP1 a VP2 činidla k VP testu. K testu HIP přidáme 2 kapky NIN činidla. Kapku činidel ZYM A a ZYM B přidáme k testům PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL a LAP. Po deseti minutách můžeme odečítat výsledky reakcí. Identifikaci po 24 hodinách provádíme, pokud měl test nízké rozlišení, pochybný nebo nepřijatelný profil nebo pokud je pro profil uvedená poznámka "identifikace není platná před 24 hodinovou inkubací". Po 24 hodinové inkubaci vyhodnocujeme znovu testy ESC, ADH, RIB a GLYG. Testy na aktivitu enzymů HIP, PYRA, β GUR, β GAL, PAL, LAP a test VP znovu neodečítáme.

Vyhodnocování testu provádíme s využitím číselného profilu. Jednotlivé testy jsou rozděleny do sedmi skupin po třech. Pokud je daný test pozitivní, hodnotí se ve skupině číslem 1, 2 nebo 4 v závislosti na jeho pořadí. Čísla se v každé skupině sečtou a dají nám výsledný sedmimístný číselný profil, který srovnáme s analytickým indexem profilů nebo využijeme identifikační software.

Pro všechny druhy SAG jsou charakteristické pozitivní výsledky na produkci acetoinu (VP), alkalické fosfatázy (PAL), leucin aminopeptidázy (LAP), arginin dihydrolázy (ADH) a trehalózy (TRE). Negativní reakce poskytují testy na hydrolýzu hippurové kyseliny (HIP), pyrolidonyl arylamidázy (PYRA), β -glukuronidázy (β GUR), ribózy (RIB), arabinózy (ARA), sorbitolu (SOR), inulinu (INU) a glykogenu (GLY).

Rozlišení jednotlivých druhů není na základě těchto testů jednoznačné. V úvahu je možné brát produkci α -galaktosidázy (α GAL), produkované z této skupiny pouze druhem *S. anginosus* a fermentace rafinózy (RAF) vyskytující se nejvíce také u *S. anginosus*. Dále schopnost produkce β -galaktosidázy (β GAL), která je nejvíce zastoupena u druhu *S. intermedius*. Fermentace laktózy (LAC) a amidonu (AMD) je nejméně pravděpodobná u druhu *S. constellatus* [30].

Tabulka 3 a 4 Procentuální pravděpodobnost pozitivních výsledků v jednotlivých testech API 20 STREP

Druh	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH
<i>S. anginosus</i>	100	0	100	0	44	0	1	99	100	100
<i>S. constellatus</i>	100	1	27	0	0	0	5	99	100	100
<i>S. intermedius</i>	100	0	87	0	0	0	44	99	100	100

Druh	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	HEM
<i>S. anginosus</i>	0	0	33	0	99	88	0	44	97	0	37
<i>S. constellatus</i>	0	0	0	0	10	72	0	0	12	0	61
<i>S. intermedius</i>	0	0	0	0	99	99	3	3	99	0	40

Zdroj: BioMérieux, 2010 (upraveno)

Fluo-Card Milleri

Před použitím tohoto testu je nutné provést minimální charakterizační testy pro identifikaci SAG zahrnující Gramovo barvení, test na katalázu, Voges Proskauer test, průkaz pozitivního argininu, negativního sorbitolu a PYR test. Fluo-Card Milleri test, vyvinutý přímo pro identifikaci druhů SAG, vyžaduje čerstvě narostlé kolonie na vhodném agaru, obvykle krevním, které rostly po dobu 24 hodin.

Test se skládá z pásu filtračního papíru se čtyřmi kruhy. První kruh slouží pro PYR test, který má v přítomnosti SAG negativní výsledek. Následující tři kruhy obsahují substráty 4-MU (methylumbeliferyl)- α -D-glukosid, 4-MU- β -D-glukosid a 4-MU- β -D-fukosid, které jsou v přítomnosti příslušného enzymu degradovány. MU slouží jako fluorogenní indikátor, kdy při rozštěpení sloučeniny dochází k jeho uvolnění ve formě 4-methylumbeliferonu a k modré fluorescenci, která může být pozorována pod ruční UV lampou. V prvním kruhu vzniká při pozitivním výsledku také fluorescence, a to při uvolnění 7-amido-4-methylkumarinu [32][33].

Postup:

1. Každý testovaný kruh navlhčíme dvěma kapkami vody.
2. Pomocí sterilní očkovací kličky vložíme 5-10 izolovaných kolonií testované bakterie do každého kruhu.
3. Testovací proužek necháme inkubovat po dobu 15-20 minut při 35-37 °C.
4. Po inkubaci sledujeme fluorescenci přidržáním pod UV lampou, po prvním pozitivním výsledku (barevné reakci) testování ukončíme.

Tabulka 5 Vyhodnocení testu Fluo-Card Milleri

Druh	Očekávaný pozitivní výsledek uváděný v procentech			
	1.PYR test	2.β-D-Fukosidáza	3.β-Glukosidáza	4.α-Glukosidáza
<i>S. intermedius</i>	0	90	47	100
<i>S. anginosus</i>	0	0	96	19
<i>S. constellatus</i>	0	0	4	90

Zdroj: Key Scientific, Fluo - Card Milleri test, 2017 (převzato)

5.2.6 Molekulárně-biologická identifikace

Tento druh identifikace bakterií je často využíván v případech, kdy se mikrob obtížně kultivuje, roste velmi pomalu a jeho identifikace je díky jeho fenotypové variabilitě obtížná. Molekulárně-biologické metody jsou vysoce spolehlivé a rychlé, bez nutnosti kultivace vzorků [34][35].

5.2.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR (Polymerase Chain Reaction) byla vyvinuta Mullisem v letech 1983-1985. Dochází při ní k zmnožení, neboli amplifikaci, vybrané sekvence nukleových kyselin. Pro zmnožení je nutné znát nukleotidovou sekvenci DNA pro návrh a přípravu komplementárních primerů (oligodeoxyribonukleotidů), které se váží na začátek a konec množené DNA. Po izolaci DNA a přidání termostabilní DNA polymerázy (Taq polymeráza), nukleotidů (ve formě trifosfátů) a primerů, důležitých pro nasednutí

polymerázy se přistupuje k samotné amplifikaci cyklickým opakováním tří základních reakcí [23][36]:

1. Tepelná denaturace – při teplotě 94-96 °C dochází k rozložení templátové DNA na dvě jednotlivá vlákna. V prvním cyklu trvá rozklad 2-3 minuty, v následujících cyklech dochází ke zkracování této doby na 25-35 sekund.
2. Vazba primerů (hybridizace) – po ochlazení na teplotu 50-65 °C na množené vlákno DNA nasednou komplementární primery. Tato reakce trvá 30-60 sekund.
3. Elongace (extenze) primerů – pomocí Taq polymerázy a nadbytku deoxyribonukleotidtrifosfátů dochází při teplotě 72 °C k prodlužování primerů a vytváření kopií příslušné DNA. Tato fáze trvá opět 30-60 sekund.

Cyklicky se tyto fáze opakují obvykle 30×, pomocí automatizovaného programu v PCR-termocykleru. Nově vytvořená vlákna DNA slouží jako templáty pro další cykly. Poslední cyklus polymerace trvá přibližně 3 minuty a celý proces je ukončen ochlazením reakční směsi na teplotu 0-4 °C. Konečnými produkty jsou dvouvláknové DNA řetězce, které se dokazují elektroforézou nebo pomocí DNA-sondy [23][36].

PCR může být v diagnostice bakterií specifická nebo širokospektrá. Při specifické PCR se může amplifikovat např. gen pro specifický protein nebo gen pro faktor virulence bakterie. Specifický primer potom nasedá na variabilní oblast, která je typická pro určitý rod nebo druh bakterie. Pro identifikaci SAG se využívá například gen pro ILY, který se vyskytuje u druhu *S. intermedius* [37][37][38].

Širokospektrá PCR je zaměřená na oblast genomu vyskytující se např. u dané skupiny mikroorganismů. V tomto případě používáme univerzální primer, který nasedá na konzervativní oblast genu. Rozdíl oproti specifické PCR metodě spočívá v nutnosti výslednou DNA identifikovat. Nejběžnějším detekčním postupem je sekvenace a následné porovnání výsledné sekvence s databázemi [38][38].

Nejvíce využívaným genem pro amplifikaci bakteriální DNA je 16S rDNA nacházející se ve všech bakteriích. Gen pro 16S rDNA je amplifikován pomocí širokospektré PCR a obsahuje variabilní i konzervativní oblasti. Použitím univerzálních primerů dochází k rozpoznání konzervativní oblasti genu, jejich nasednutí a amplifikaci i variabilních oblastí. Sekvenování 16S rDNA poskytuje také alternativu pro diagnostiku infekcí, u kterých může být nízká citlivost hemokultivace. V případě SAG se jedná především o kmeny způsobující infekční endokarditidu [35][39].

5.2.7 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie

Metody hmotnostní spektrometrie jsou založeny na převádění neutrálních molekul analytu na ionty a jejich následné rozlišení dle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní spektrometry jsou složeny z třech základních částí:

1. Iontový zdroj – kde dochází k ionizaci neutrálních molekul analyzované látky na ionty a jejich urychlení do analyzátoru.
2. Hmotnostní analyzátor – je umístěn ve vakuu. Dochází zde k rozdělení iontů dle jejich poměru hmotnosti k náboji.
3. Detektor – slouží k detekci separovaných iontů a analýze jejich kvantitativního zastoupení [40].

5.2.7.1 MALDI-TOF MS

Jako MALDI-TOF MS označujeme hmotnostní spektrometrii s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s využitím průletového analyzátoru. V posledních letech se tato metoda začala v mikrobiologii využívat pro identifikaci bakterií a hub jako velmi přesná, rychlá a ve srovnání s molekulárně-biologickými metodami méně provozně nákladná technika. Dokáže identifikovat rod, druh a v některých případech i kmen bakterií na základě analýzy spektra především ribozomálních, ale i dalších proteinů v buňce. Detekce se může provádět přímo z pozitivních hemokultur, vzorků moče, mozkomíšního moku a jiných biologických materiálů. Nicméně nejvíce se využívá identifikace čistých kultur bakterií kultivovaných na krevním agaru [38][40][41][42].

Příprava vzorku je ovlivněna chemickým složením buněčné stěny. Pro gramnegativní bakterie je možné využívat tzv. přímé profilování, kdy se přenesou bakteriální kolonie z agaru přímo na ocelovou desku a překryje se roztokem matrice. U grampozitivních bakterií (tudíž i u SAG) se pro lepší výsledky identifikace provádí extrakce kyselinou mravenčí, která nám zajistí chemické rozrušení buněčné stěny. Je možné využít také enzymatické rozrušení buněčné stěny pomocí lysozymu. Poté je vzorek přenesen nejčastěji pomocí kuchyňského párátko na terčík ocelové destičky a nechá se oschnout na vzduchu [40][41][43][44].

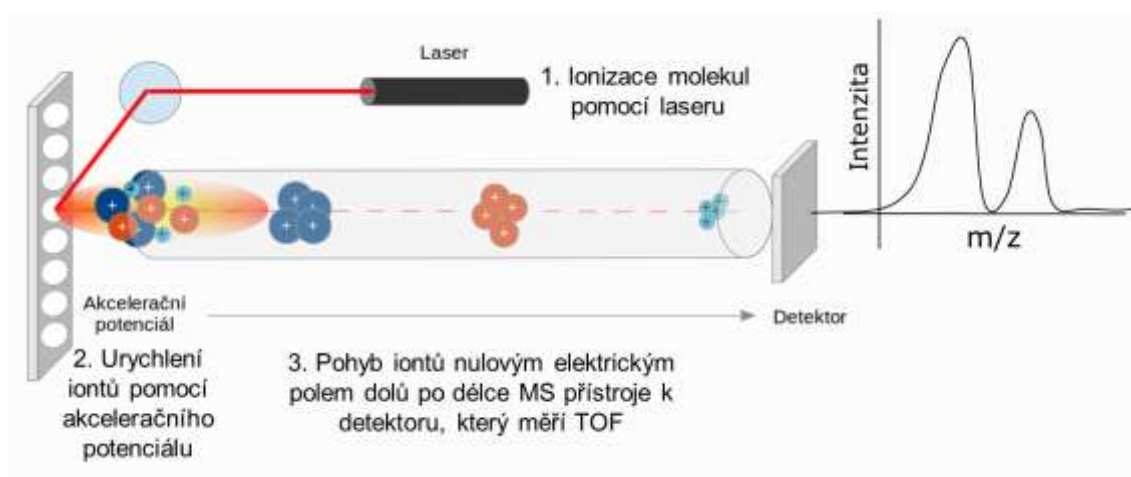
K analyzovanému vzorku se následně přidá vhodná matrice v nadbytku. Matrice bývají aromatické karboxylové kyseliny, které jsou rozpuštěné ve vodě a vhodném

rozpouštědla (např. aceton, acetonitril, kyselina trifluoroctová). Nejvíce zastoupené matrice jsou deriváty kyseliny benzoové a skořicové. Matrice ze vzorku vyextrahuje analyzované proteiny a vytvoří s ním krystalky [40][41].

Destička je po zaschnutí vložena do vakuovaného prostoru, kde na vzorek s matricí působí laser (nejčastěji dusíkový). Nejprve dochází ke kontaktu laseru s matricí, která energii absorbuje, předá analytu a začne se odpařovat. Přijetím energie se vzorek ionizuje, přechází do plynného stavu a ionty urychlené silným elektrickým polem putují různou rychlostí trubicí hmotnostního analyzátoru doby letu (TOF). Rychlost je ovlivněna hmotností a nábojem, přičemž lehčí a více nabité ionty putují rychleji. Měří se doba, která uplyne od laserového impulzu po dopad iontů na detektor [41][42][44].

Výsledná informace o době letu iontů nám poskytne charakteristické hmotnostní spektrum nazývané peptidový/proteinový profil, který porovnáváme s databází obsahující spektra (profily) známých bakterií. Peptidový/proteinový profil je charakteristický pro určitý rod, druh či kmen bakterie za dodržení stejných podmínek při přípravě a analýze vzorku [41][44].

Obrázek 2 Technika MALDI-TOF MS



Zdroj: Holčík Jiří, Komenda Martin a kol., Matematická biologie: e-learningová učebnice [online], 2016 (převzato)

5.3 SAG jako tradiční patogeny hnisavých procesů

Vzhledem k běžnému výskytu SAG na sliznicích gastrointestinálního a urogenitálního traktu nebyly tyto druhy v minulosti považovány za možné patogeny. Objevuje se ale stále častější hlášení těchto bakterií jako původců především abscesů a bakteriemií [46].

Málokdy jsou tyto bakterie schopny vyvolat infekce u zdravých lidí, většinou jsou u nich diagnostikovány maligní onemocnění, cukrovka, HIV infekce, zubní kazy a jiné ústní infekce. Souvislost byla nalezena i s nadměrným užíváním alkoholu a kouřením [46].

Způsob šíření bakterií může být přímou cestou, hematogenní cestou nebo dochází k přenosu bakterií při chirurgickém zákroku či traumatu. U přímého šíření dochází k přestupu infekce z blízkého zánětlivého ložiska, hematogenní cestou se šíří infekce i ze vzdáleného zánětlivého zdroje [46].

Nejvíce jsou publikovány případy, kdy dochází k šíření SAG z orálních infekcí, často z gingivitidy a paradontitidy, abscesů zubů nebo neléčeného zubního kazu. V roce 2009 Ng a Mukhopadhyay zveřejnili případ, kdy došlo k náhlé bakteriémii a septickému šoku s původcem *S. constellatus* po částečné extrakci zubu kvůli paradontálnímu abscesu. Livingston a Perez-Colon publikovali v roce 2014 vzácný případ bakteriémie a jaterního abscesu, způsobených *S. intermedius* u zdravého člověka po běžném čištění zubů [47][48].

Přestože *S. constellatus* a *S. anginosus* způsobují infekce častěji, jsou tyto druhy spojeny se vznikem hlubokých abscesů daleko méně než *S. intermedius*. Kromě vyšší aktivity hydrolytických enzymů, které napomáhají zkapalnění hnisu a šíření infekce tkání, produkuje *S. intermedius* již zmíněný intermedilysin. Ten lyzuje pouze lidské buňky a to zejména hepatocyty [49].

5.3.1 Mozkové abscesy

Jako mozkový absces označujeme infekční ložisko nacházející se přímo v mozkovém parenchymu. Rozmezí výskytu mozkových abscesů se uvádí od 0,4 do 0,9 na 100 000 jedinců. Větší pravděpodobnost vzniku je u imunokompromitovaných pacientů, u kterých vznik onemocnění může vyvolat mnoho příčin zahrnujících bakteriální, mykotické a parazitické původce, nicméně mozkové abscesy se vyskytují i

u pacientů imunokompetentních. U těchto jedinců hrají roli především bakteriální původci. Mezi ty nejčastější řadíme bakterie rodu *Streptococcus*, a to hlavně druhy viridující streptokoky a *S. pneumoniae*. Dalšími významnými bakteriálními původci jsou *Staphylococcus aureus* a *S. epidermidis* [50][57].

U přímého šíření dochází k přestupu infekce nejčastěji ze středouší nebo vedlejších dutin nosních a také z dentálních infekcí. Tyto primární zdroje infekce ovlivňují místo vzniku mozkového abscesu. Při infekci středouší a mastoidálního výběžku vzniká přímým šířením nejčastěji absces temporálního laloku. Absces frontálního laloku vzniká v souvislosti se zánětem frontálních nebo etmoidálních dutin. Infekce sfenoidálních dutin může zapříčinit absces frontálního a temporálního laloku. Hematogenní cestou se šíří infekce obvykle z infekční endokarditidy. Způsob šíření má vliv na počet mozkových abscesů. Při přímém šíření vzniká zpravidla absces jeden, zatímco šíření hematogenní způsobuje často abscesů více [50].

Vznik mozkového abscesu má několik fází. Nejprve vzniká cerebritida, kterou doprovází zvýšený počet polymorfonukleárů. Po dnech až týdnech dochází k nekróze a kolikvaci tkáně v centru zánětu. Následně dochází k zapouzdřování destruované tkáně provázené akumulací fibroblastů a astroglíí, ty v konečné fázi tvoří membránu, která je dobře vaskularizovaná. Tato zapouzdřovací fáze může být nebezpečná, jelikož může vyvolávat záchvaty [50][58].

5.3.2 Jaterní abscesy

Vznik jaterních abscesů je spjat s bakteriální (pyogenní), houbovou nebo amébovou infekcí, přičemž bakteriální příčina tvoří až 80 % všech případů. Nejčastěji izolované bakterie ze vzorků jsou *Escherichia coli* a bakterie z rodů *Klebsiella*, *Enterococcus* a také *Streptococcus* [46].

Pyogenní jaterní absces obvykle způsobují bakterie, které se šíří hematogenně. Krví se dostanou do jater přes vrátnicovou žílu, biliární strom nebo jaterní artérii. Je také možnost přímého šíření infekce z přilehlých orgánů [51].

První případy jaterních abscesů způsobených SAG byly zaznamenány v roce 1975. Na rozdíl od jaterních abscesů způsobených jinými bakteriemi jsou většinou monomikrobiální a symptomy onemocnění trvají déle [51].

Mezi faktory, které mohou přispět k rozvoji jaterního abscesu způsobeného SAG, se uvádí také karcinom tlustého střeva a méně často divertikulární choroby [52].

Přítomnost karcinomu tlustého střeva narušuje sliznici tlustého střeva a vyvolává ztrátu integrity mukózní bariéry. Narušení bariéry umožní přestup SAG ze střevní sliznice, kde se nacházejí jako běžní komenzálové, do krevního oběhu a vzhledem k návaznosti portálního oběhu k jejich nahromadění v jaterním parenchymu a vzniku abscesu [52].

Divertikly jsou výčlipky tlustého střeva, které mají úzký vstup, tudíž v nich často dochází k nahromadění stolice a jejímu zahušťování. Důsledkem může být zánět těchto výčlipků označovaný jako divertikulitida. U imunokompromitovaných pacientů s divertikulitidou až v 27,5 % případů dochází k tvorbě septických sraženin a jejich hematogenní diseminaci, což může mít za následek absces jater. Tento rizikový faktor je ale z neznámého důvodu pro abscesy způsobené SAG poměrně vzácný [46].

5.3.3 Respirační infekce

Bakterie SAG hrají důležitou roli ve vzniku plicních abscesů nebo empyému a byly zaznamenány i jako původci bakteriální pneumonie. Pneumonie je zánětlivé onemocnění plicního parenchymu a stále si drží třetí místo v mortalitě způsobené infekčními chorobami. Bakteriální pneumonii obvykle vyvolávají patogeny *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Staphylococcus aureus*. Jako plicní empyém označujeme hnis nacházející se v pleurální dutině. Přestože plicní empyém úzce souvisí s pneumonií, jako jeho hlavní původce se uvádí *S. intermedius* a až poté *S. pneumoniae* [53][54].

Jako patogen plicních abscesů a empyému se SAG udává až v 13-44 % případů a pneumonie v důsledku SAG byla zaznamenána v 2-5 % případů. Zjistilo se, že pneumonie způsobená SAG bývá zpravidla komplikována pleurálním výpotkem, často hnisavým. Tato komplikace se objevuje u pneumonií způsobených SAG mnohem častěji než u pneumonií způsobených jinými bakteriemi, proto by se mělo při přítomnosti empyému myslet na SAG jako na původce pneumonie [53][55].

Je známo několik mechanismů, které umožňují šíření SAG a následný vznik respiračního onemocnění. Stejně jako u mozkových a jaterních abscesů dochází k přímému šíření z okolních tkání nebo hematogenní diseminaci, rozvoj onemocnění

může být ale i následkem chirurgického ošetření nebo traumatu. Dalším možným způsobem je aspirace těchto komenzálních bakterií z dutiny ústní nebo jícnu do dolních cest dýchacích. Tento mechanismus se uplatňuje především u starších pacientů s věkem okolo 70-80 let [53].

Bylo zjištěno, že respirační infekce spojené se SAG se z 13-45 % vyskytují spolu s jinými bakteriemi. Tyto smíšené infekce jsou až z 24 % tvořené spolu s anaerobními bakteriemi. Anaerobní bakterie mají vliv na intenzitu infekce, jelikož bylo in vitro prokázáno, že se SAG množí v jejich přítomnosti až třikrát rychleji [53][56].

5.3.4 Ostatní infekce

SAG nejčastěji způsobuje abscesy mozku jater a respirační choroby. Je ale známo několik případů, kdy skupina těchto bakterií způsobila infekční endokarditidu, pyomyositidu, osteomyelitidu a některé další infekce jako intraabdominální a slezinný absces.

5.3.4.1 Infekční endokarditida

Infekční endokarditida je charakterizována jako zánět vnitřní výstelky srdce, obvykle srdečních chlopní, ale může být napaden i nástěnný endokard či oblast septa. Vyvolat onemocnění jsou schopny téměř všechny druhy bakterií nebo hub. Nejvíce jsou ale spojovány s viridujícími streptokoky, bakteriemi ze skupiny HACEK (rody *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*) a bakterií *S. aureus* [59].

Infekční endokarditida způsobená SAG je často doprovázena hnisavými komplikacemi, mezi které patří absces myokardu nebo purulentní perikarditida. Ve studii z roku 2004, která byla zveřejněna Patrickem CY Wooem a kol., se uvádí, že infekční endokarditida způsobená SAG vykazuje vyšší mortalitu než infekční endokarditida způsobená jinými viridujícími streptokoky [49].

5.3.4.2 Pyomyositida

Pyomyositida je zánětlivé onemocnění kosterních svalů, které se týká obvykle velkých svalů kolem pánve a dolních končetin. Nejčastěji pyomyositidu způsobuje

běžný komenzál kůže *S. aureus* po jejím poranění. Původci onemocnění mohou být výjimečně také anaerobní bakterie [60].

Bylo zaznamenáno několik případů pyomyositidy spojené s SAG. Jako nejvíce zastoupené druhy v souvislosti s touto infekcí se uvádějí *S. intermedius* a *S. anginosus*. Cesta vzniku infekce však není zcela objasněná, protože svalová tkáň není příliš náchylná vůči infekci a bakteriémie ji zřídka způsobí. V rozvoji onemocnění se uplatňují pravděpodobně receptory pro fibronektin, umístěné na svalových buňkách a také hyaluronidáza *S. intermedius* [60].

Přestože bývá pyomyositida spjata s onemocněním velkých svalů kolem pánve a dolních končetin, tak v roce 2015 v Japonsku Yasuhiro Tanaka a kol. prezentovali případ pyomyositidy levého musculus rhamboideus u 70ti letého imunokompetentního pacienta způsobený *S. intermedius* a *S. anignosus*. Ty byly identifikovány z hnisu po drenáži postiženého svalu. Jako zdroj infekce byla nakonec diagnostikována periodontitida, ačkoli bakterie v hnisu z periodontitidy nebyly potvrzeny [60].

5.3.4.3 Osteomyelitida

Zánětlivý proces kostí vede k postupné destrukci kostní hmoty. Vyskytuje se z 80 % u pacientů dětského věku. Bakteriální osteomyelitida je nejčastěji způsobena bakterií *S. aureus*, u novorozenců streptokoky skupiny β , kojence a malé děti často infikuje *H. influenzae* [61].

Osteomyelitida způsobená skupinou *S. anginosus* je neobvyklá. U dětí jsou obvykle infikovány tubulární kosti ramen a nohou. Dospělí pacienti jsou nejčastěji postiženi infekcí v mandibule či maxille u přímého šíření z dutiny ústní a infekce bývají obvykle polymikrobiální. Hematogenním šířením zpravidla vzniká monomikrobiální osteomyelitida obratlů [63].

Osteomyelitida může být doprovázena i spontánní zlomeninou. Tuto komplikaci zaznamenali například v roce 2017 E.HCC Janssen a kol. u 57 letého pacienta s patologickou zlomeninou femuru. Předpokládalo se, že se jedná o metastatické onemocnění kostí. Po biopsii kostní dřevě a odebrání hemokultury byla diagnostikována osteomyelitida způsobená skupinou *S. anginosus*, konkrétně druhem *S. intermedius*. I přes změnu antibiotické léčby pacient onemocnění podlehl. Případ je výjimečný vzhledem k tomu, že pro osteomyelitidu způsobenou SAG není běžná lokalizace

v oblasti femuru a pacient také nevykazoval žádný rizikový faktor pro vznik onemocnění. Pitva prokázala pouze cirhózu jater, přičemž funkce jater při přijetí nebyla omezena [63].

5.4 SAG jako emergentní patogeny

Skupina streptokoků *anginosus* je spojena také s exacerbacemi plicních onemocnění, konkrétně cystické fibrózy a chronické obstrukční plicní nemoci (COPD). Pro identifikaci těchto patogenů ze vzorků z dýchacích cest je vhodné použít již výše zmíněné semi-selektivní agary NAS a McKay, které podporují jejich růst [62].

5.4.1 Cystická fibróza

Jedná se o vrozené, autozomálně recesivně dědičné onemocnění, charakterizováno přítomností vysoké koncentrace chloridových iontů v potu a produkcí vysoce viskózního hlenu v pankreatu, dýchacím, trávicím a rozmnožovacím ústrojí. Pacienti obvykle podléhají nemoci v důsledku poškození plic nebo kardiopulmonálního selhání. Délka života nemocných se ale díky rozvoji medicíny prodlužuje, předpokládané přežití dětí s CF narozených v současné době je 40-50 let [64][65].

Patogeneze spočívá v mutaci genu pro transmembránový regulátor vodivosti (CFTR). Tento gen kóduje CFTR protein neboli chloridový kanál, regulující transport solí (sodných i chloridových iontů) přes buněčnou membránu. Dysfunkce tohoto kanálu může vést k nadměrné absorpci sodíku (zároveň i vody) epiteliálním natriovým kanálem, který je normálně pomocí CFTR tlumen, a k následnému snížení obsahu tekutiny v hlenu, jeho stáze a možnosti rozvoje bakteriální infekce. Dalším důsledkem funkční nebo strukturální poruchy tohoto kanálu může být zvýšení koncentrace chloridových iontů v hlenu, který přestává být hypotonický, což vede k nemožnosti aktivace antimikrobiálních peptidů. Následkem je porucha obranných mechanismů plic a rozvoj chronických infekcí [64][65].

Za hlavní patogen podílející se na exacerbaci onemocnění se až v 80% uvádí *Pseudomonas aeruginosa*. Je ale známo, že infekce dýchacích cest spjaté s cystickou fibrózou bývají většinou polymikrobiální. Přítomné mohou být rody *Rothia*, *Prevotella*, *Streptotrophomonas*, *Streptococcus* a další [66].

Z viridujících streptokoků bývají ve vzorcích pacientů s cystickou fibrózou zaznamenány převážně skupiny *S. salivarius*, *S. parasanguinis* a *anginosus*. Viridující streptokoky mají zajímavou schopnost zvýšit patogenitu hlavního původce *P. aeruginosa*, jelikož stimulují expresi genů jeho faktorů virulence [66][67].

Důležitost identifikace ostatních bakterií, které se podílejí na exacerbaci cystické fibrózy, spočívá ve volbě terapie. Vzhledem k problému rezistence *P. aeruginosa* se v tomto případě jako alternativa využívá antibiotická léčba bakterií, které nesou odpovědnost za zhoršení stavu hlavního patogenu. Kromě toho, že SAG mohou být součástí polymikrobiální infekce, byly zaznamenány i případy, kdy zastupovaly roli hlavního patogenu ve zhoršení stavu pacientů s cystickou fibrózou [67].

5.4.2 Chronická obstrukční plicní nemoc (COPD)

COPD je dlouhodobé zánětlivé onemocnění dolních cest dýchacích, které vzniká zejména jako následek vdechování tabákového kouře a jiných škodlivých látek. Dochází k zužování průdušek (chronické bronchitidě) a k zániku plicní tkáně (emfyzému plic). Elastická vlákna plicních sklípků jsou destruována, s tím souvisí snížení maximálních výdechových průtoků a zhoršení vyprazdňování plic. V bronchiolích postižených zánětem se hromadí hlen, produkovaný ve zvýšené míře plicemi, který způsobuje ještě větší obstrukci dýchacích cest. Pacient trpí kašlem, často s expektorací a dušností [68].

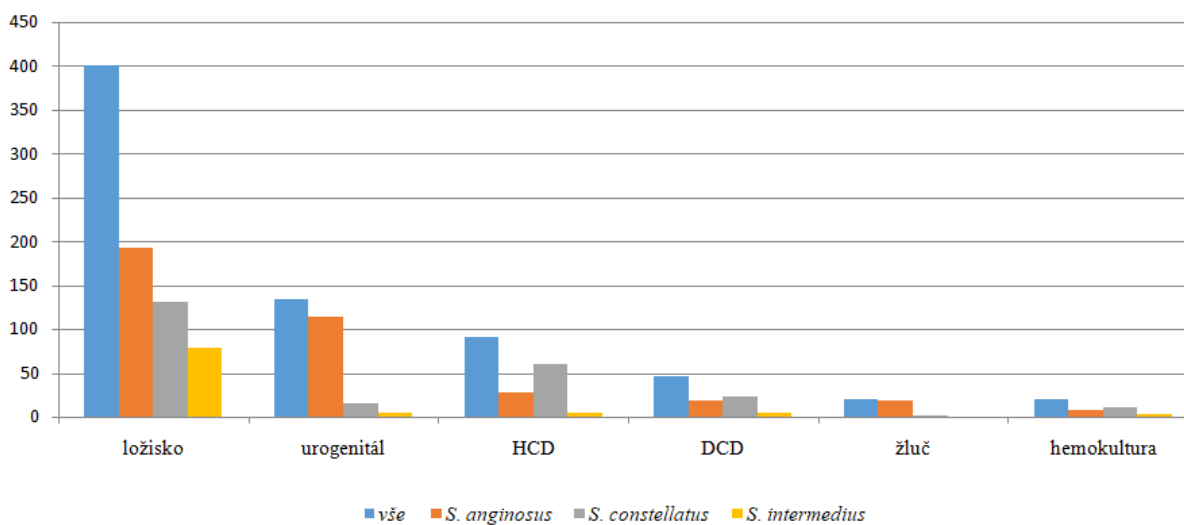
Exacerbace onemocnění může mít různé, nejen bakteriální příčiny. Více než polovina případů je ale spjata s infekcí bakteriální či virovou. Jako hlavní patogen se uvádí *H. influenzae*, další často izolovaní původci jsou také *S. pneumoniae* a *M. catarrhalis* [69].

6. VÝSLEDKY

V následujících grafech jsou zobrazeny datové údaje o pacientech, u kterých byly identifikovány bakterie SAG. Data za časové období od roku 2000 do roku 2018 byla poskytnuta mikrobiologickou laboratoří FN Olomouc. Celkem bylo druhy SAG zjištěny v 721 vzorcích od 686 pacientů různého věku.

6.1 Lokalita odběru a frekvence nejvíce zastoupených diagnóz

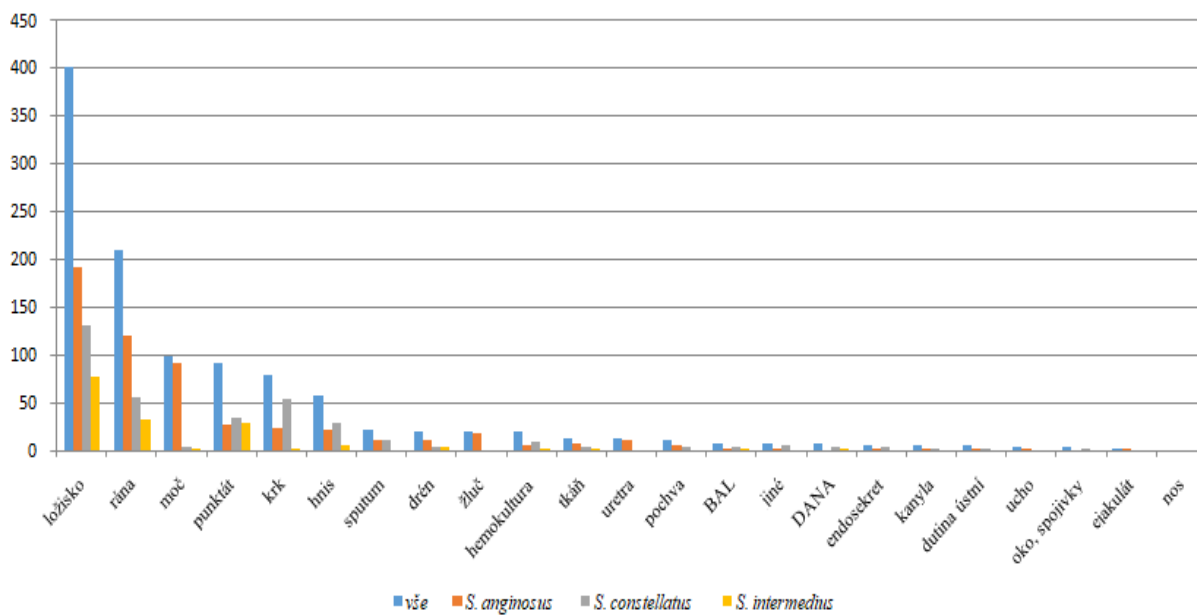
Zastoupení sledovaných druhů v různých systémech těla



Graf 1

V přehledu grafu 1 můžeme vidět nejvíce zastoupená místa odběru. Zatímco z infekčního ložiska/léze, močové nebo pohlavní soustavy (urogenitál) a žluči byl nejčastěji izolován *S. anginosus*, v dýchacích cestách a v krvi byl nejfrekventovanějším druhem *S. constellatus*.

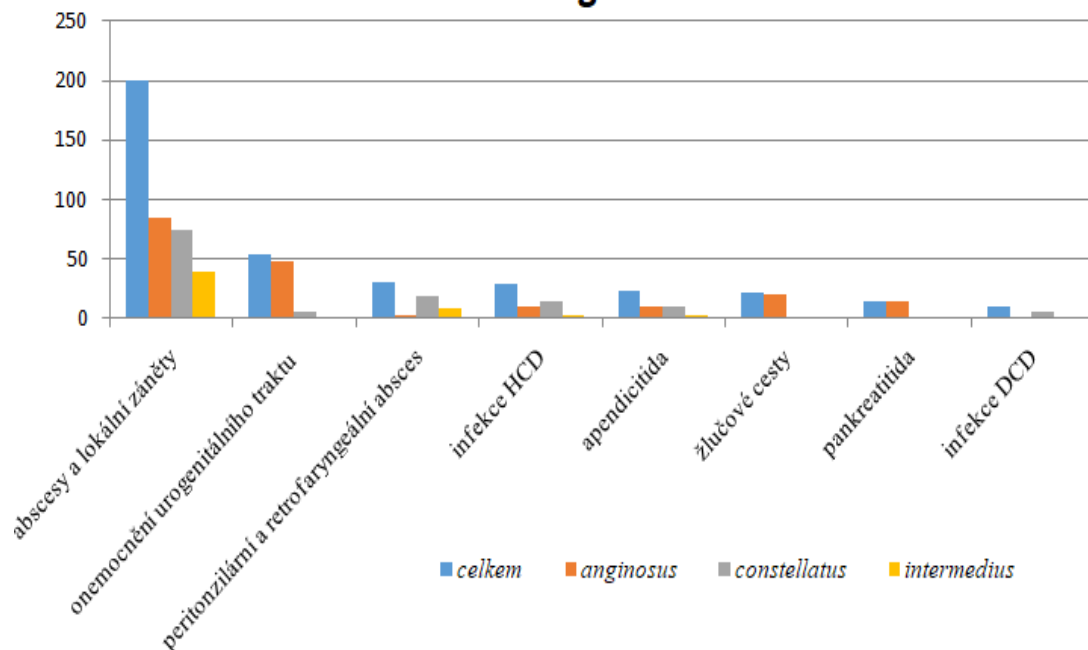
Zastoupení sledovaných druhů podrobněji v jednotlivých lokalitách



Graf 2

Graf 2 znázorňuje všechny typy materiálů, které byly v našem vzorku pacientů odebrány. K těm méně zastoupeným patří oko, ejakulát a nos. Naopak nejvíce vzorků pocházelo z infekčního ložiska/léze či rány.

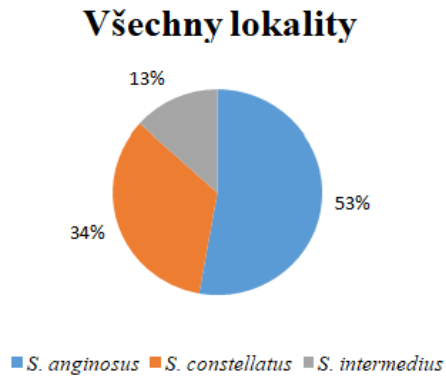
Frekvence nálezu jednotlivých druhů ve vztahu k diagnóze



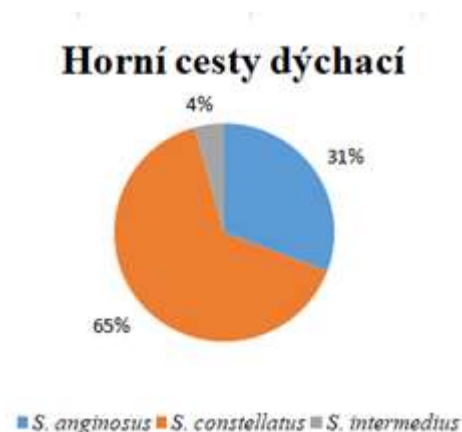
Graf 3

Graf 3 zobrazuje nejčastější diagnózy spojené s izolací SAG v naší studii. K těm nejvíce zastoupeným patřily abscesy a lokální záněty, způsobené obvykle druhem *S. anginosus*. Byl zde ale oproti ostatním diagnózám výrazně vyšší výskyt druhu *S. intermedius*. Následovala onemocnění urogenitálního traktu, kde byl původce téměř vždy *S. anginosus*. U třetí nejčastější diagnózy (abscesy v okolí faryngu) dominoval jako hlavní patogen *S. constellatus*, významnou roli zde hrál také *S. intermedius*, pro kterého to byla druhá nejčetněji zastoupená diagnóza.

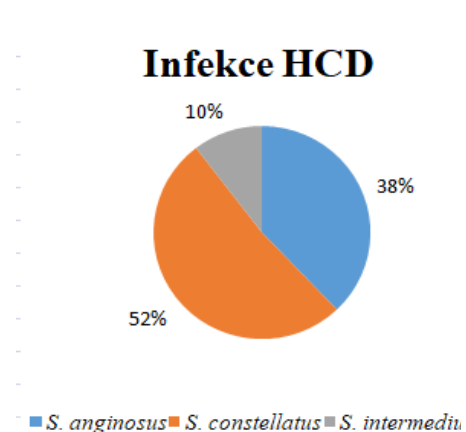
6.2 Závislost výskytu jednotlivých druhů SAG v daných lokalitách na vzniku infekce



Graf 4



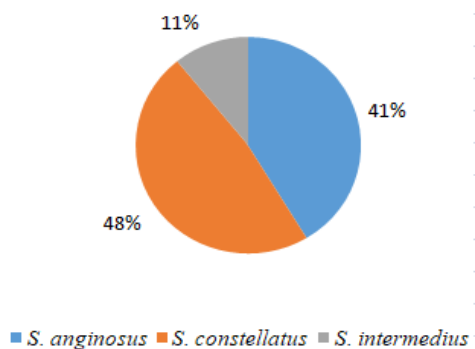
Graf 5



Graf 6

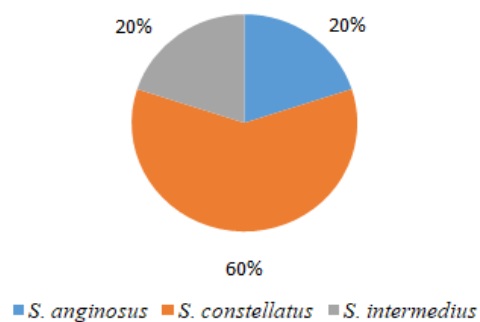
Z grafu 4 můžeme vyčíst, že nejvíce zastoupeným druhem ve všech lokalitách byl *S. anginosus*, nejméně se vyskytoval *S. intermedius*. Nejčastějším druhem izolovaným z HCD (graf 5) byl *S. constellatus*, který byl v této lokalitě také nejčastěji asociován s infekcí (graf 6). Relativně silnějšími patogeny na sliznicích této lokality jsou ale pravděpodobně *S. anginosus* a *S. intermedius*.

Dolní cesty dýchací



Graf 7

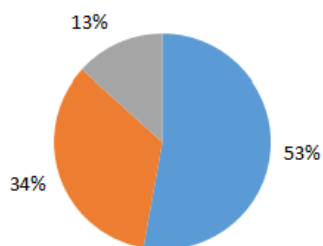
Infekce DCD



Graf 8

V DCD (graf 7) byl *S. constellatus* méně dominantní, ale byl zde zřetelně více asociován s infekcemi DCD (graf 8) než *S. anginosus*, který byl v této lokalitě pravděpodobně spíše kolonizujícím druhem. Naopak ještě výraznější patogenní potenciál měl v DCD pravděpodobně nejméně zastoupený *S. intermedius*.

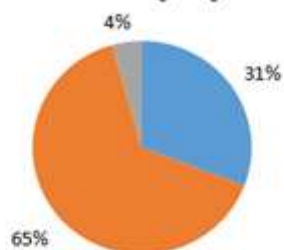
Všechny lokality



■ *S. anginosus* ■ *S. constellatus* ■ *S. intermedius*

Graf 9

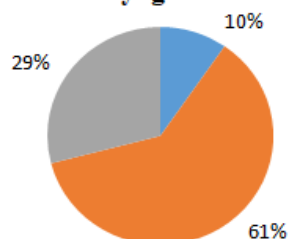
Horní cesty dýchací



■ *S. anginosus* ■ *S. constellatus* ■ *S. intermedius*

Graf 10

Peritonzilární a retrofaryngeální absces

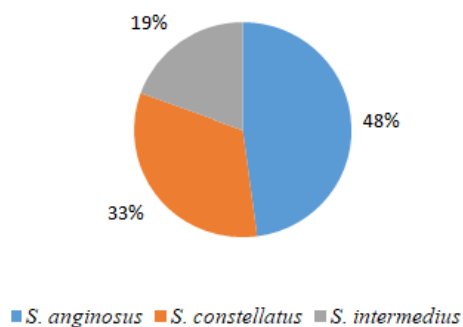


■ *S. anginosus* ■ *S. constellatus* ■ *S. intermedius*

Graf 11

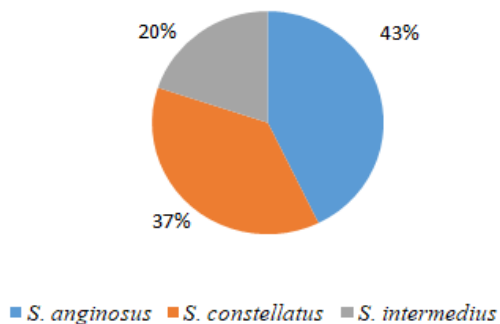
Zatímco *S. anginosus* se jevil jako relativně silně asociovaný se slizniční infekcí HCD (graf 10), měl velmi malý potenciál podílet v této lokalitě na patogenезi abscesů ve tkáni (graf 11). U *S. constellatus* byla asociace přítomnosti na sliznici s přítomností v abscesu proporcionalní, naproti tomu *S. intermedius* měl v této lokalitě zjevně velký potenciál pronikat do tkáně a spolupůsobit tam v patogenезi ložiskové infekce.

Ložisko



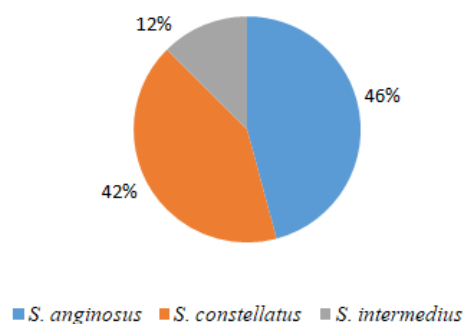
Graf 12

Abscesy a lokální záněty



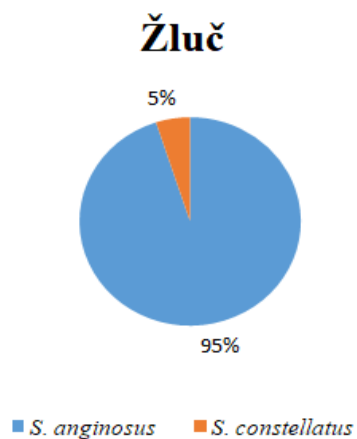
Graf 13

Apendicitida



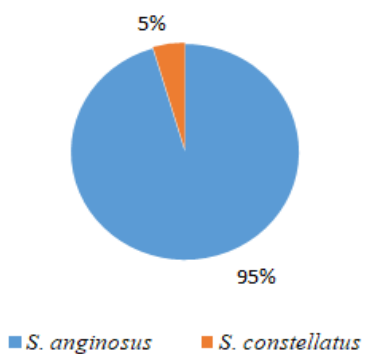
Graf 14

Při záchytu jednotlivých druhů z ložiska infekce (graf 12) jejich relativní zastoupení velmi dobře odpovídalo diagnóze. U abscesů a lokálních zánětů (graf 13) v jiných lokalitách byl *S. anginosus* zastoupen relativně častěji než v okolí HCD, opět byla zřejmá poměrně výrazná role *S. intermedius*. Nejčastější ložiskový zánět v našem souboru byla apendicitida (graf 14), která relativním zastoupením druhů rovněž téměř kopírovala průměrné rozložení u ložiskových infekcí obecně.



Graf 15

Infekce žlučových cest



Graf 16

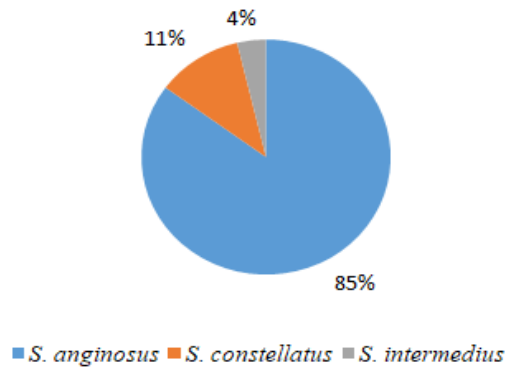
Pankreatitida



Graf 17

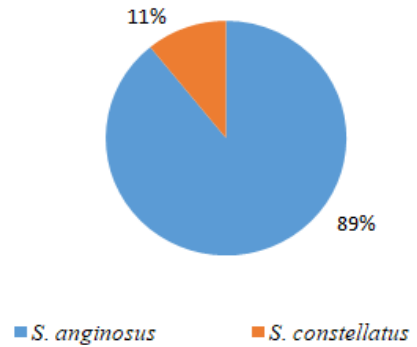
Zcela rozdílný obraz poskytují dva další ložiskové záněty – v případě pankreatitidy (graf 17) a infekce žlučových cest (graf 16) hrál v našem souboru téměř monopolní roli *S. anginosus*.

Urogenitální systém



Graf 18

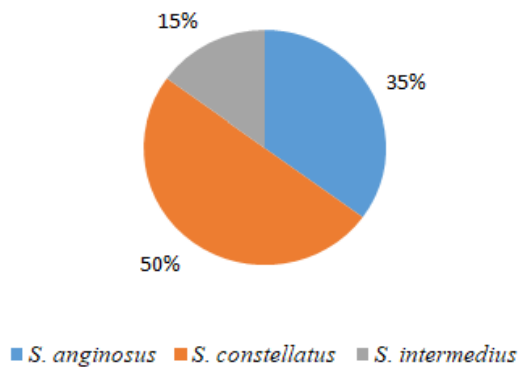
Infekce urogenitálního systému



Graf19

Podobně dominantní bylo zastoupení *S. anginosus* ve vzorcích z urogenitálního systému (graf 18), stejně jako jeho asociace s infekcemi v této lokalitě (graf 19).

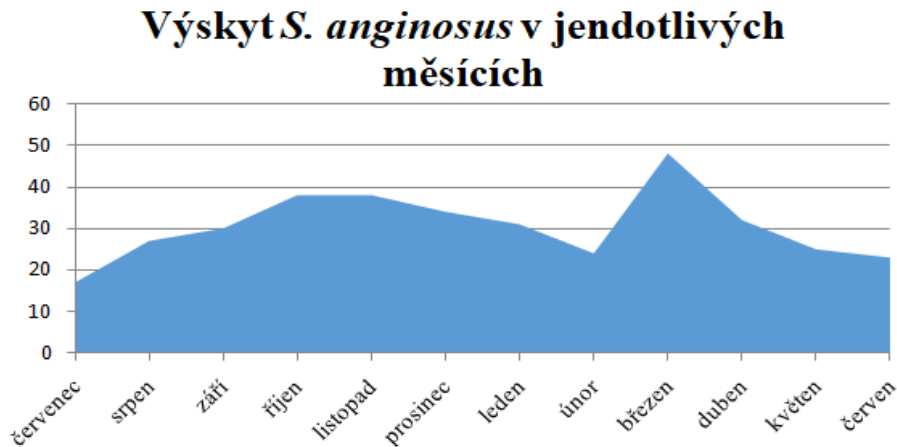
Krev



Graf 20

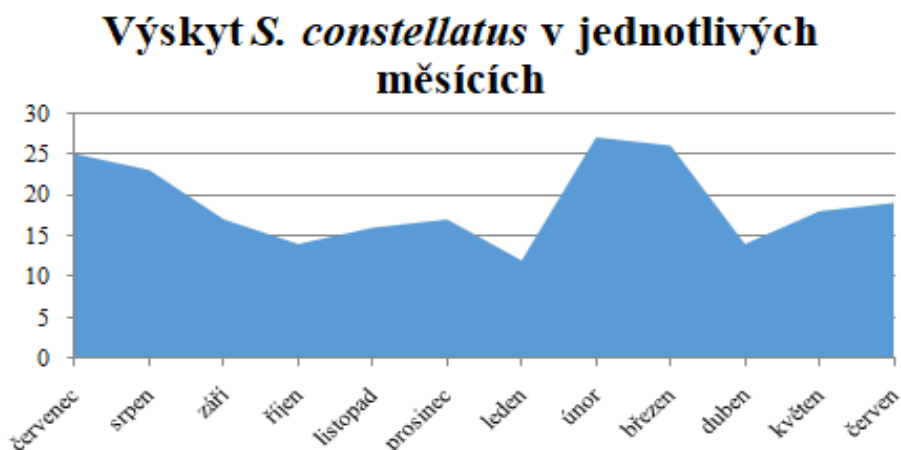
Potenciálně nejzávažnější byl výskyt sledovaných druhů v hemokultuře (n=20), který nám znázorňuje graf 20. Bylo zde nápadné zejména poměrně vysoké zastoupení druhu *S. intermedius* ve srovnání s jeho zastoupením v jiných lokalitách.

6.3 Kolísání výskytu sledovaných druhů SAG v různých měsících



Graf 21

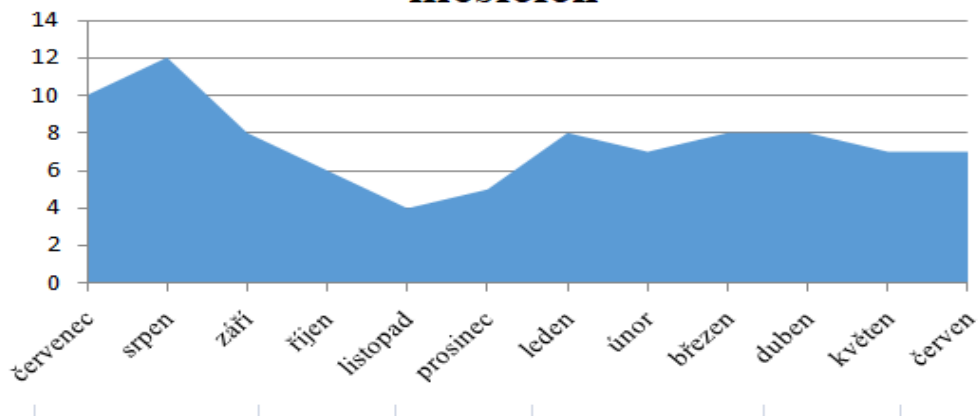
V grafu 21 můžeme vidět, že největší výskyt *S. anginosus* byl zaznamenán v březnu. Druhý vrchol můžeme vidět v měsících říjen a listopad. Nejnižší výskyt byl v červenci.



Graf 22

Graf 22 ukazuje vrchol výskytu *S. constellatus* v únoru. Jeho záchyt byl vysoký i v letních měsících červenci a srpnu.

Výskyt *S. intermedius* v jednotlivých měsících

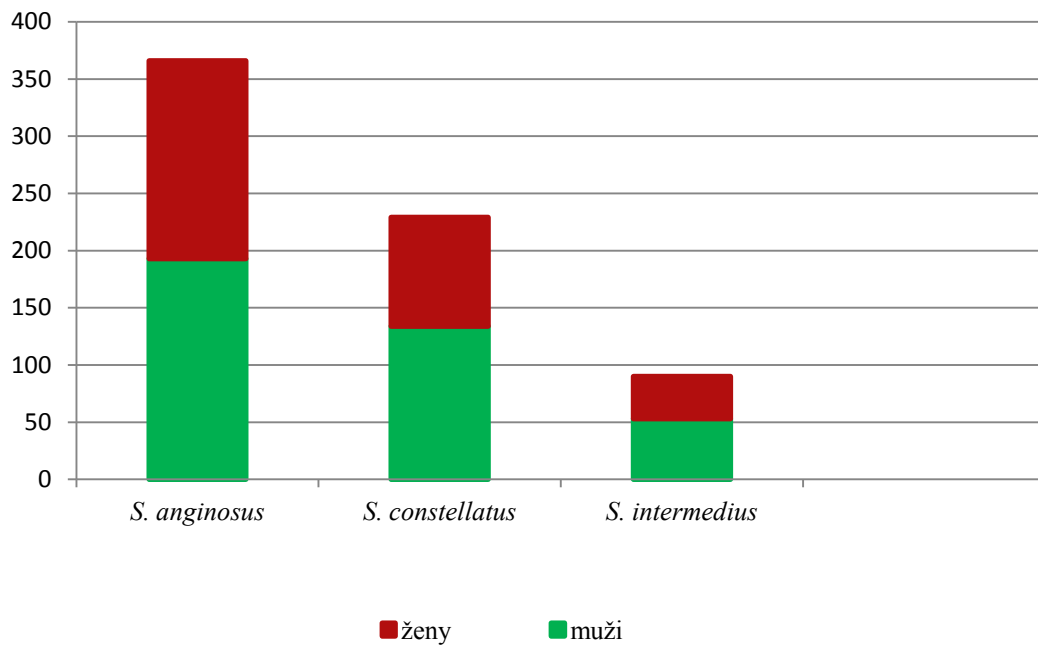


Graf 23

Graf 23 ukazuje, že *S. intermedius* měl oproti *S. anginosus* a *S. constellatus* vrchol výskytu v srpnu, nejméně se objevoval v listopadu. Od ledna do června byla míra jeho výskytu stejná.

6.4 Pohlaví a průměrný věk pacientů, u kterých byly zaznamenány bakterie SAG

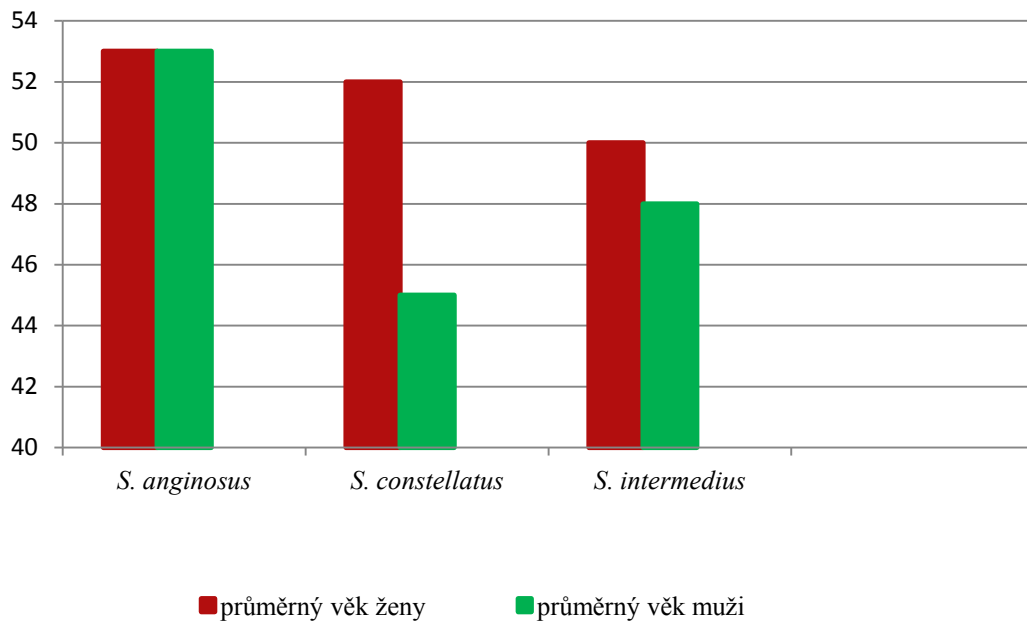
Závislost výskytu jednotlivých druhů na pohlaví



Graf 24

V grafu 24 můžeme vidět poměr počtu výskytu mužů a žen u jednotlivých druhů. U všech druhů bylo více zastoupené mužské pohlaví. Nejmenší rozdíl můžeme pozorovat u *S. anginosus*, kdy bylo infikováno 193 mužů a 173 žen. Největší naopak u *S. intermedius*, kdy se nakazilo 53 mužů a 37 žen.

Průměrný věk mužů a žen infikovaných SAG



Graf 25

Graf 25 zobrazuje průměrný věk mužů a žen, u kterých byly identifikovány bakterie SAG. U *S. anginosus* byl průměrný věk u obou pohlaví stejný, a to 53 let. Naopak průměrný věk pacientů u *S. costellatus* se lišil v závislosti na pohlaví. Věk žen se v průměru pohyboval okolo 52 let, věk mužů kolem 45 let. Průměrný věk pacientů, u kterých byl zaznamenán *S. intermedius* se v závislosti na pohlaví lišil pouze nevýznamně. Muži měli v průměru 48 let, ženy 50 let.

7. DISKUSE

Nejvíce zastoupeným druhem byl v našem vzorku pacientů *S. anginosus* (53 %), následoval *S. constellatus* (34 %) a nejméně se vyskytoval *S. intermedius* (13 %). Tento výsledek souhlasí s literaturou. Podobné zastoupení uvádí například i studie z roku 2014 publikována Ralphem K. Junckerstorffem a kol. (*S. anginosus* 55,4 %, *S. constellatus* 28,6 %, *S. intermedius* 16 %). O. Kobo a kol. v roce 2017 zveřejnili studii, do které bylo zahrnuto 263 pacientů, u nichž byly v letech 2009-2015 zjištěny ze vzorků bakterie SAG. *S. anginosus* se zde vyskytoval v 69 %, *S. constellatus* v 17,1 % a *S. intermedius* v 13,7 % [70][71]

Vzorky pozitivní na SAG byly odebrány nejčastěji z ložiska, následoval urogenitální trakt a třetím nejvíce zastoupeným místem byl respirační trakt. Stejně rozložení uvádí i Whiley RA a kol. ve studii z roku 1992, ve které bylo identifikováno 153 kmenů SAG.[72]

Infekce horních i dolních dýchacích cest byly v našem vzorku pacientů způsobeny převážně druhem *S. constellatus*. Jako hlavní patogen infekcí urogenitálního systému byl zjištěn *S. anginosus*. Oba výsledky se shodují s prací Whileyho RA a kol., která byla publikována v roce 1992. Jako nejdůležitějšího původce intraabdominálních infekcí uvádí Whileyho studie druh *S. anginosus*. Tomuto tvrzení odpovídají i naše výsledky nejvíce zastoupených intraabdominálních infekcí apendicitidy, pankreatitidy a infekce žlučových cest. Bakteriémie byla ve všech třech výše zmíněných studiích způsobena především druhem *S. anginosus* a méně často *S. constellatus*. *S. intermedius* zde nebyl uveden jako původce bakteriémie. V naší studii byl z 50 % v krvi identifikován *S. constellatus*, z 35 % *S. anginosus* a z 15 % *S. intermedius*. Neobvykle vysoký výskyt *S. intermedius* v hemokultuře by mohl souviset s vysokým výskytem infekcí čelistí (n=9) způsobených tímto druhem a jeho následným šířením krevním řečištěm k orgánům. Přestože se v literatuře *S. intermedius* často spojuje se vznikem jaterních a mozkových abscesů, v naší studii byl nejvíce zastoupený u peritonzilárního abscesu (n=9). Ani u tohoto abscesu však nepatřil mezi hlavního původce, kterým byl v 61 % *S. constellatus*. *S. constellatus* byl spjat s rolí hlavního původce hlubokých infekcí krku i ve studii publikované Hurleym R. a kol. z roku 2017 [71][73]

Výskyt v jednotlivých měsících byl u každého druhu odlišný. Zatímco *S. anginosus* a *S. constellatus* vykazovaly nejvyšší vrchol výskytu na jaře, *S. intermedius* kulminoval v letních měsících, především v srpnu. To je s největší pravděpodobností způsobeno schopností každého druhu vyvolávat odlišné infekce. *S. anginosus* a *S. constellatus* jsou asociovány spíše s infekcemi, které často vznikají na podkladě prochlazení právě v měsících jarních či podzimních. *S. intermedius* je spojován s hlubokými abscesy, jejichž vznik je více podporován v teplém letním počasí. Rozdílné sezónní variace u různých druhů SAG dosud nebyly v literatuře popsány, pro potvrzení našeho pozorování bude ale ještě nutné delší sledování pro získání většího vzorku pro kvalitní zhodnocení statistické významnosti pozorovaných sezónních flutuací.

Pokud se podíváme na pohlaví, zjistíme, že u všech třech druhů převažovalo zastoupení mužského pohlaví. Toto tvrzení je v souladu s literaturou, která uvádí, že výskyt je častější u mužského pohlaví nebo není známý významný rozdíl v pohlaví.[53][71]

Průměrný věk pacientů v této studii činil 50,2 let. V práci, kterou publikovali Junckerstorff RK a kol. v roce 2014 byl průměrný věk pacientů 54,2 let. Studie autorů O. Kobo a kol. z roku 2017 uvádí průměrný věk pacientů 56,8 let, což se od našeho výsledku liší přibližně o šest let. Obecně lze však poznamenat, že se SAG nejčastěji vyskytují u pacientů ve středním věku. Výrazný rozdíl ve věku pacientů různého pohlaví s pozitivní izolací *S. constellatus* dosud nebyl popsán a jde proto o cennou informaci pro další analýzu těchto případů. [70][71]

8. ZÁVĚR

V této práci byl ze streptokoků skupiny *anginosus* nejčastěji identifikován druh *S. anginosus*, následně *S. constellatus* a méně často *S. intermedius*. *S. constellatus* byl četně zastoupen u respiračních infekcí, *S. anginosus* u infekcí intraabdominálních a infekcí urogenitálního traktu. *S. intermedius* byl nejrozšířenější u abscesů, v našem případě u peritonzilárních a retrofaryngeálních, kde však neplnil roli hlavního patogena. Překapující byl i jeho vysoký záchyt v krvi.

Zatímco *S. anginosus* a *constellatus* způsoboval infekce především na jaře, *S. intermedius* měl vrchol výskytu v letních měsících. Tento výsledek pozorování je vysvětlován především tendencí jednotlivých druhů způsobovat odlišné typy infekcí.

Pacienti infikovaní SAG bývají obvykle ve středním věku, v této studii byl jejich průměrný věk 50,2 let. Výskyt těchto bakterií byl častější u mužského pohlaví.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

FN – fakultní nemocnice

SAG - streptokoky skupiny anginosus

ILY - intermedilysin

IL-8 - Interleukin 8

MAC komplex - komplex napadající membránu

SLS - Streptolysin S

HA - kyselina hyaluronová

ATB - antibiotika

NET - neutrofilní extracelulární past

PCR - Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce

NaCl - chlorid sodný

pH - potential of hydrogen, potenciál vodíkových iontů

HIP - kyselina hippurová

ESC - eskulin citrát železitý

PYRA - β -naftylamid pyroglutamová kyselina

α GAL - 6-brom-2-naftyl- α D-galaktopyranosid

β GUR - naftol ASBI-glukuronová kyselina

β GAL - 2-naftyl- β D-galaktopyranosid

PAL - 2-naftylfosfát

LAP - L-leucin- β -naftylamid

ADH - L-arginin

RIB - D-ribóza

ARA - L-arabinóza

MAN - D-manitol

SOR - D-sorbitol

LAC - D-laktóza

TRE- D-trehalóza
INU- inulin
RAF - D-rafinóza
ADM - škrob
GLYG - glykogen
HEM – hemolýza
McF - McFarland
VP - acetoin
PAL - alkalická fosfatáza
LAP - leucin aminopeptidáza
ADH - arginin dihydroláza
RIB - ribóza
ARA - arabinóza
HIV - virus lidské imunitní nedostatečnosti
CFTR protein - transmembránový regulátor vodivosti
IgG - imunoglobulin G
PYR test - test pro průkaz enzymu pyrrolidonyl arylamidázy
KOH - hydroxid draselný
4-MU - 4-methylumbeliferon
UV- lampa - ultrafialová lampa
Taq polymeráza - *Thermus aquaticus* polymeráza
DCD - dolní cesty dýchací
HCD - horní cesty dýchací

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Vybrané druhy streptokoků a jejich vlastnosti	11
Tabulka 2 základní biochemická identifikace odlišující SAG od ostatních viridujících streptokoků.....	21
Tabulka 3 a 4 Procentuální pravděpodobnost pozitivních výsledků v jednotlivých testech API 20 Strep	25
Tabulka 5 Vyhodnocení testu Fluo-Card Milleri	26

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Lýza buněk pomocí intermedilysinu	14
Obrázek 2 Technika MALDI-TOF	29

12. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Zastoupení sledovaných druhů v různých systémech těla	37
Graf 2 Zastoupení sledovaných druhů podrobněji v jednotlivých lokalitách	38
Graf 3 Frekvence nálezu jednotlivých druhů ve vztahu k diagnóze	39
Graf 4 Všechny lokality	40
Graf 5 Horní cesty dýchací	40
Graf 6 Infekce HCD	40
Graf 7 Dolní cesty dýchací	41
Graf 8 Infekce HCD	41
Graf 9 Všechny lokality	42
Graf 10 Horní cesty dýchací	42
Graf 11 Peritonzilární a retrofaryngeální absces	42
Graf 12 Ložisko	43
Graf 13 Abscesy a lokální záněty	43
Graf 14 Apendicitida	43
Graf 15 Žluč	44
Graf 16 Infekce žlučových cest	44
Graf 17 Pankreatitida	44
Graf 18 Urogenitální systém	45
Graf 19 Infekce urogenitálního systému	45
Graf 20 Krev	45
Graf 21 Výskyt <i>S. anginosus</i> v jednotlivých měsících	46
Graf 22 Výskyt <i>S. constellatus</i> v jednotlivých měsících	46
Graf 23 Výskyt <i>S. intermedius</i> v jednotlivých měsících	47
Graf 24 Závislost výskytu jednotlivých druhů na pohlaví	48
Graf 25 Průměrný věk mužů a žen infikovaných SAG	49

13. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] JULÁK, Jaroslav. Úvod do lékařské bakteriologie. Karolinum, 2006, s. 305-307.
- [2] GREENWOOD, David, Richard C. B. SLACK, John F. PEUTHERER a Jiří SCHINDLER. Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění : patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169-365-0
- [3] PIERCE, Kerry. *The Streptococcus anginosus group, often underestimated, unrecognized, and misidentified* [online]. California [cit. 2018-05-09]. Dostupné z: <https://hardydiagnostics.com/wp-content/uploads/2016/05/Streptococcus-anginosus-group-by-Kerry-Pierce.pdf>
- [4] RUOFF, K L. Streptococcus anginosus ("Streptococcus milleri"): the unrecognized pathogen. Clinical Microbiology Reviews [online]. 1988, 1(1), 102-108 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1128/CMR.1.1.102. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.1.1.102>
- [5] JENSEN, A., T. HOSHINO a M. KILIAN. Taxonomy of the Anginosus group of the genus Streptococcus and description of Streptococcus anginosus subsp. whileyi subsp. nov. and Streptococcus constellatus subsp. viborgensis subsp. nov. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY [online]. 2013, 63(Pt 7), 2506-2519 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1099/ijs.0.043232-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.043232-0>
- [6] 3-OLSON, Adam B, Heather KENT, Christopher D SIBLEY, et al. Phylogenetic relationship and virulence inference of Streptococcus Anginosus Group: curated annotation and whole-genome comparative analysis support distinct species designation. BMC Genomics [online]. 2013, 14(1), 895- [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1186/1471-2164-14-895. ISSN 1471-2164. Dostupné z: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-895>
- [7] -FACKLAM, R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clinical Microbiology Reviews [online]. 2002, 15(4), 613-630 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1128/CMR.15.4.613-630.2002. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.4.613-630.2002>
- [8] ASAM, D. a B. SPELLERBERG. Molecular pathogenicity of Streptococcus anginosus. Molecular Oral Microbiology [online]. 2014, 29(4), 145-155 [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1111/omi.12056. ISSN 20411006. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/omi.12056>

- [9] KANAMORI, Shuzo, Takashi SHINZATO, Atsushi SAITO a Nobuchika KUSANO. The role of the capsule of the *Streptococcus milleri* group in its pathogenicity. *Journal of Infection and Chemotherapy* [online]. 2004, 10(2), 105-109 [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1007/s10156-004-0305-7. ISSN 1341321x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X0471079X>
- [10] MISHRA, A. K. a P.-E. FOURNIER. The role of *Streptococcus intermedius* in brain abscess. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. 2013, 32(4), 477-483 [cit. 2018-03-30]. DOI: 10.1007/s10096-012-1782-8. ISSN 0934-9723. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-012-1782-8>
- [11] TWETEN, Rodney K., Eileen M. HOTZE a Kristin R. WADE. The Unique Molecular Choreography of Giant Pore Formation by the Cholesterol-Dependent Cytolysins of Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2015, 69(1), 323-340 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1146/annurev-micro-091014-104233. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-091014-104233>
- [12] BOYD, Courtney M., Edward S. PARSONS, Richard A. G. SMITH, John M. SEDDON, Oscar CES a Doryen BUBECK. Disentangling the roles of cholesterol and CD59 in intermedilysin pore formation. *Scientific Reports* [online]. 2016, 6(1), - [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1038/srep38446. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep38446>
- [13] GIDDINGS, Kara S, Ji ZHAO, Peter J SIMS a Rodney K TWETEN. Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2004, 11(12), 1173-1178 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1038/nsmb862. ISSN 1545-9993. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nsmb862>
- [14] Nagamune H, Whiley RA, Goto T, et al. Distribution of the Intermedilysin Gene among the Anginosus Group Streptococci and Correlation between Intermedilysin Production and Deep-Seated Infection with *Streptococcus intermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(1):220-226
- [15] ASAM, Daniela, Stefanie MAUERER a Barbara SPELLERBERG. Streptolysin S of *Streptococcus anginosus* exhibits broad-range hemolytic activity. *Medical Microbiology and Immunology* [online]. 2015, 204(2), 227-237 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1007/s00430-014-0363-0. ISSN 0300-8584. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00430-014-0363-0>
- [16] YOSHIMURA, Mamiko, Akiko AMANO, Takahiko OHO, Haruka FUKAMACHI, Toshihiko KOGA, Yoshio NAKANO a Yasuo YOSHIDA. Lcd from *Streptococcus anginosus* encodes a C-S lyase with α,β -elimination activity that degrades l-cysteine. *Microbiology* [online]. 2002, 148(12), 3961-3970 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1099/00221287-148-12-3961. ISSN 1350-0872. Dostupné z:

<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-148-12-3961>

- [17] KURZBAN, G. P., L. CHU, J. L. EBERSOLE a S. C. HOLT. Sulfhemoglobin formation in human erythrocytes by cystalysin, an L-cysteine desulfhydrase from *Treponema denticola*. *Oral Microbiology and Immunology* [online]. 1999, 14(3), 153-164 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1034/j.1399-302X.1999.140303.x. ISSN 0902-0055. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-302X.1999.140303>
- [18] PECHARKI, D., F. C. PETERSEN a A. Aa. SCHEIE. Role of hyaluronidase in *Streptococcus intermedius* biofilm. *Microbiology* [online]. 2008, 154(3), 932-938 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1099/mic.0.2007/012393-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/012393-0>
- [19] TRAPPETTI, Claudia, Aras KADIOGLU, Melissa CARTER, Jasvinder HAYRE, Francesco IANNELLI, Gianni POZZI, Peter W. ANDREW a Marco R. OGGIONI. Sialic Acid: A Preventable Signal for Pneumococcal Biofilm Formation, Colonization, and Invasion of the Host. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. 2009, 199(10), 1497-1505 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1086/598483. ISSN 0022-1899. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/598483>
- [20] SOONG, G. Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2006, 116(8), 2297-2305 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1172/JCI27920. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI27920>
- [21] SOONG, G. Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2006, 116(8), 2297-2305 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1172/JCI27920. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI27920>
- [22] BOOTHROYD, Peter. a Xuân Nam. PHẠM. Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi. Singapore: Institute of Southeast Asian Studies, 2000.
- [23] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010. ISBN 978-80-86850-04-8. (str. 169, 177, 197, 217, 252)
- [24] SIBLEY, C. D., M. E. GR JIRSA, prim. RNDr Roman. Provádění, možnosti a interpretace mikrobiologických vyšetření, Hemokultivace [online]. [cit. 2018-03-06]. Dostupné z: http://www.klaudianovanemocnice.cz/assets/File.ashx?id_org=427004&id_dokumenty=1665
- [25] INWIS, T. R. FIELD, M. D. PARKINS, J. C. NORGAARD, D. B. GREGSON, H. R. RABIN a M. G. SURETTE. McKay agar enables routine quantification of the

- 'Streptococcus milleri' group in cystic fibrosis patients. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2010, 59(5), 534-540 [cit. 2018-02-08]. DOI: 10.1099/jmm.0.016592-0. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.016592-0>
- [26] WAITE, R. D., D. W. WAREHAM, S. GARDINER a R. A. WHILEY. A Simple, Semiselective Medium for Anaerobic Isolation of Anginosus Group Streptococci from Patients with Chronic Lung Disease. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2012, 50(4), 1430-1432 [cit. 2018-02-08]. DOI: 10.1128/JCM.06184-11. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.06184-11>
- [27] RACLAVSKY, Vladislav, Radko NOVOTNY, Lubomir STARY, et al. NAS agar is more suitable than McKay agar for primary culture of Streptococcus milleri group (SMG) fastidious bacteria, *S. intermedius* in particular. *Folia Microbiologica* [online]. 2017, 62(1), 11-15 [cit. 2018-02-08]. DOI: 10.1007/s12223-016-0470-y. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-016-0470-y>
- [28] PathoDextra Souprava pro stanovení streptokokových skupin [online]. UK: Oxoid, 2015 [cit. 2018-03-08]. Dostupné z: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/MBD/Instructions/X7733B-CS.pdf>
- [29] RAPID ANGINOSUS ID KIT [online]. Copyright © 1996 - 2017 by Hardy Diagnostics [cit. 2018-02-15]. Dostupné z: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/RapidAnginosusIDKit.html
- [30] Streptococcus laboratory general methods. Centers for disease control and prevention [online]. Centers for disease control and prevention, 2014 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/streplab/downloads/general-methods-sections1-2.pdf>
- [31] Identification system for Streptococcaceae and related organisms, API 20 Strep. www.biomerieux.com [online]. Francie: BioMérieux, 2010 [cit. 2018-03-15]. Dostupné z: https://www.mediray.co.nz/media/15816/om_biomerieux_test-kits_package_insert-20600.pdf
- [32] KS5300/KS530020 FLUO-CARD MILLERI. Key Scientific Products [online]. Copyright © 2012-2018, 25-Aug-17 [cit. 2018-02-14]. Dostupné z: <https://www.keyscientific.com/files/New%20Website%20Files/Fluo%20Milleri/MILL10NEW.PDF>

- [33] E. FLYNN, CYNTHIA a KATHRYN L. RUOFF. Identification of “Streptococcus milleri” Group Isolates to the Species Level with a Commercially Available Rapid Test System. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY [online]. James Holmer Wright Pathology Laboratories¹ and Microbiology Laboratories,² Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 0211: Copyright, American Society for Microbiology, 10 July 1995, p. 2704–2706 [cit. 2018-02-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/pmc/articles/PMC228559/pdf/332704.pdf>
- [34] SIQUEIRA, J. F., I. N. ROCAS, S. R. MORAES a K. R. N. SANTOS¹. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. International Endodontic Journal [online]. 2002, 35(4), 345-351 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1046/j.1365-2591.2002.00485.x. ISSN 0143-2885. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2591.2002.00485.x>
- [35] WOO, P.C.Y., S.K.P. LAU, J.L.L. TENG, H TSE a K.-Y. YUEN. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clinical Microbiology and Infection [online]. 2008, 14(10), 908-934 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x. ISSN 1198743X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X1461002>
- [36] JÍLEK, Petr. Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0459-0. (str.65,66)
- [37] MIYAKE, YOICHIRO, KAZUTO OHKURA, TAKUYA MAEDA, et al. Rapid identification of Streptococcus intermedius by PCR with the ily gene as a species marker gene. Journal of Medical Microbiology [online]. 2002, 51(2), 178-186 [cit. 2018-03-09]. DOI: 10.1099/0022-1317-51-2-178. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/0022-1317-51-2-178>
- [38] KUBASOVÁ, Bc. Tereza. Druhá determinace streptokoků molekulárně-biologickými metodami u pacientů s infekční endokarditidou. Brno, 2012. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce MUDr. Tomáš Freiburger, Ph.D.
- [39] PLEVOVÁ, Bc. Kristina. Mikrobiální DNA v klinických vzorcích jako marker invazivních infekcí u imunokompromitovaných pacientů. Brno, 2016. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce MGR. MARTINA LENGEROVÁ, Ph.D.

- [40] JAHNOVÁ, : Bc. Aneta. Identifikace bakterií z pozitivních hemokultur pomocí hmotnostní spektrometrie. Hradec Králové, 2014. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce MUDr. Pavla Paterová
- [41] NYČ, prim. MUDr. Otakar Ph.D. a Bc. Karel BUBENÍČEK. MALDI TOF - ŠPIČKOVÁ TECHNOLOGIE PRO MIKROBIOLOGII 21. STOLET. KRÁLOVEHRADECKÝ LABORATORNÍ BULLETIN [online]. Medila, Axis - cz, 2015, (3. září 2015), 1-2 [cit. 2018-03-15]. Dostupné z: http://www.medila.cz/website/download/bulletin/medila_bull_3_2015_hk_KOMPL ET.pdf/_showFile.php
- [42] BURSOVÁ, PH.D., MVDr. Šárka, Mgr. Marta DUŠKOVÁ, PH.D., MVDr. Lenka NECIDOVÁ, PH.D., doc. MVDr. Renáta KARPÍŠKOVÁ, PH.D. a Mgr. Petra MYŠKOVÁ. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Mikrobiologické laboratorní metody [online]. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, s. 13-15 [cit. 2018-03-15]. ISBN 978-80-7305-676-6. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/realizovane-klicove-aktivity/skripta/lis-2013-2014/mikrobiologicke-laboratorni-metody.pdf>
- [43] WOODS, K., D. BEIGHTON a J. L. KLEIN. Identification of the 'Streptococcus anginosus group' by matrix-assisted laser desorption ionization - time-of-flight mass spectrometry. Journal of Medical Microbiology [online]. 2014, 63(Pt_9), 1143-1147 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.1099/jmm.0.076653-0. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.076653-0>
- [44] KAČALOVÁ, bc. Magdaléna. Optimalizace podmínek přípravy vzorků pro MALDI-MS profilování bakterií [online]. Brno, 2011 [cit. 2018-03-15]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/6283703-Optimalizace-podminek-pripravy-vzorku-pro-maldi-ms-profilovani-bakterii-diplomova-prace.html>. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita. Vedoucí práce Mgr. Ondřej Šedo, Ph.D.
- [45] SINGHAL, Neelja, Manish KUMAR, Pawan K. KANAUIA a Jugsharan S. VIRDI. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology [online]. 2015, 6, - [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00791/abstract>
- [46] AKUZAWA, Nobuhiro, Takashi HATORI, Yonosuke KITAHARA a Masahiko KURABAYASHI. Multiple liver abscesses and bacteremia caused by Streptococcus

- constellatus infection: a case report. *Clinical Case Reports* [online]. 2017, 5(1), 69-74 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1002/ccr3.774. ISSN 20500904. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ccr3.774>
- [47] NG, Kay Wei Ping a Amartya MUKHOPADHYAY. Streptococcus constellatus bacteremia causing septic shock following tooth extraction: a case report. *Cases Journal* [online]. 2009, 2(1), 6493- [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1186/1757-1626-2-6493. ISSN 1757-1626. Dostupné z: <http://casesjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-1626-2-6493>
- [48] LIVINGSTON, Lachara V. a Elimarys PEREZ-COLON. Streptococcus intermedius Bacteremia and Liver Abscess following a Routine Dental Cleaning. *Case Reports in Infectious Diseases* [online]. 2014, 2014, 1-4 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1155/2014/954046. ISSN 2090-6625. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/crid/2014/954046/>
- [49] WOO, Patrick C.Y, Herman TSE, Kai-ming CHAN, et al. streptococcus milleri” endocarditis caused by S treptococcus anginosus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 2004, 48(2), 81-88 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2003.09.011. ISSN 07328893. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889303002128>
- [50] SMÍŠKOVÁ, MUDr. Dita. Ložiskové nitrolební procesy infekční etiologie. *Neurologie pro praxi* [online]. 2006, (3), 134-137 [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2006/03/05.pdf>
- [51] Ganju SA, Gautam N, Sharma G. Pyogenic liver abscess associated with oral flora bakterium, Streptococcus anginosus in a patient with underlying tuberculosis. *Indian J Pathol Microbiol* 2017, 60:587-9. Dostupné z: <http://www.ijpmonline.org/article.asp?issn=0377-4929;year=2017;volume=60;issue=4;spage=587;epage=589;aulast=Ganju>
- [52] RAWLA, Prashanth, Anantha R. VELLIPURAM, Sathyajit S. BANDARU a Jeffrey PRADEEP RAJ. Colon Carcinoma Presenting as Streptococcus anginosus Bacteremia and Liver Abscess. *Gastroenterology Research* [online]. 2017, 10(6), 376-379 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.14740/gr884w. ISSN 1918-2805. Dostupné z: <http://www.gastrores.org/index.php/Gastrores/article/view/884>
- [53] NOGUCHI, Shingo, Kazuhiro YATERA, Toshinori KAWANAMI, et al. The clinical features of respiratory infections caused by the Streptococcus anginosus group. *BMC Pulmonary Medicine* [online]. 2015, 15(1), - [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1186/s12890-015-0128-6. ISSN 1471-2466. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2466/15/133>

- [54] MCCAULEY, L. a N. DEAN. Pneumonia and empyema: causal, casual or unknown. *Journal of thoracic disease* [online]. 2015, 7(6), 992–998 [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/pubmed/26150912>
- [55] CATALYA, Stephen, Bushra KOMAL, Sunil TULPULE, Nazar RAOOF a Shuvendu SEN. Isolated *Streptococcus intermedius* pulmonary nodules. *IDCases* [online]. 2017, 8, 48-49 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1016/j.idcr.2017.03.007. ISSN 22142509. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214250917300264>
- [56] NEUMAYR, A, R KUBITZ, JG BODE, P BILK a D HÄUSSINGER. Multiple liver abscesses with isolation of *streptococcus intermedius* related to a pyogenic dental infection in an immuno-competent patient. *European Journal of Medical Research* [online]. 2010, 15(7), 319- [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1186/2047-783X-15-7-319. ISSN 2047-783X. Dostupné z: <http://eurjmedres.biomedcentral.com/articles/10.1186/2047-783X-15-7-319>
- [57] AL MOUSSAWI, Hassan, Michael KRZYZAK, Zainab AWADA a Jean M CHALHOUB. *Streptococcus Intermedius* Brain and Diverticular Abscesses After Dental Manipulation: A Case Report. *Cureus* [online]. , - [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.7759/cureus.2061. ISSN 2168-8184. Dostupné z: <https://www.cureus.com/articles/10133-streptococcus-intermedius-brain-and-diverticular-abscesses-after-dental-manipulation-a-case-report>
- [58] ESPLIN, Nathan, John W STELZER, Sean ALL, Sundeep KUMAR, Ejaz GHAFFAR a Sayed ALI. A Case of *Streptococcus anginosus* Brain Abscess Caused by Contiguous Spread from Sinusitis in an Immunocompetent Patient. *Cureus* [online]. , - [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.7759/cureus.1745. ISSN 2168-8184. Dostupné z: <https://www.cureus.com/articles/8684-a-case-of-streptococcus-anginosus-brain-abscess-caused-by-contiguous-spread-from-sinusitis-in-an-immunocompetent-patient>
- [59] BENEŠ, J., D. BARTOŠOVÁ, J. BERAN, Z. ČERNÝ, V. DOSTÁL, et al. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009, 651 s. ISBN 978-80-7262-644-
- [60] TANAKA, Yasuhiro, Kenichi TAKAYA, Go YAMAMOTO, Isaku SHINZATO a Toshiro TAKAFUTA. Solitary Pyomyositis of the Left Rhomboideus Muscle Caused by *Streptococcus anginosus* and *Streptococcus intermedius* in an Immunocompetent Person. *Case Reports in Infectious Diseases* [online].

- 2015, 2015, 1-4 [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1155/2015/321520. ISSN 2090-6625. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/criid/2015/321520/>
- [61] MUNTAU, Profes. Dr. Ania Carolina. *Pediatric: Překlad 6. vydání*. 6. Praha: Grada Publishing, 2014, s. 157. ISBN 978-80-247-4588-6.
- [62] NAVRATILOVA, Lucie, Jan BARDON, Radko NOVOTNY, et al. The *Streptococcus milleri* group in chronic obstructive pulmonary disease. *Biomedical Papers* [online]. , - [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.5507/bp.2016.017. ISSN 12138118. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2016.017.html>
- [63] JANSSEN, E.H.C.C., L.C.J. DE BREE, K.M. KANT a P. VAN WIJNAGAARDEN. Spontaneous fracture of the femur due osteomyelitis caused by the *Streptococcus anginosus* group. *The Netherlands Journal of Medicine* [online]. 2017, 3(75), 121-124 [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/pubmed/28469049>
- [64] FILA, PH.D., MUDr. Libor. Cystická fibróza u dospělých. *Interní medicína*[online]. 2014, 2(16), 54-60 [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2014/02/03.pdf>
- [65] JAKUBEC, MUDr. Petr. Cystická fibróza. *Interní medicína* [online]. 2006, 5, 235-239 [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2006/05/07.pdf>
- [66] FILKINS, L. M., T. H. HAMPTON, A. H. GIFFORD, et al. Prevalence of *Streptococci* and Increased Polymicrobial Diversity Associated with Cystic Fibrosis Patient Stability. *Journal of Bacteriology* [online]. 2012, 194(17), 4709-4717 [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1128/JB.00566-12. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00566-12>
- [67] SIBLEY, C. D., M. D. PARKINS, H. R. RABIN, K. DUAN, J. C. NORGAARD a M. G. SURETTE. A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, 105(39), 15070-15075 [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1073/pnas.0804326105. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804326105>
- [68] VONDRA, V., S. KOS, E. KRÁLÍKOVÁ, J. MUSIL, F. SALAJKA a J. ZATLOUKAL. *Jak žít s CHOPN?* [online]. Praha: Nakladatelství Vltavín, 2011

[cit. 2018-04-17]. ISBN 978-80-86587-41-7. Dostupné z:
http://www.copn.cz/dokumenty/webmenu2177/Jak_zit_s_chopn_27.pdf

- [69] HEROUT, MUDr. Vladimír. Exacerbace chronické obstrukční plicní nemoci [online]. 2011, 1(13), 18-19 [cit. 2018-04-17]. Dostupné z:
<https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2011/01/04.pdf>
- [70] KOBO O, NIKOLA S, GEFFEN Y, PAUL M. The pyogenic potential of the different *Streptococcus anginosus* group bacterial species: retrospective cohort study. *Epidemiol Infect* 2017;1–5. doi:10.1017/S0950268817001807.
- [71] Junckerstorff RK, Robinson JO, Murray RJ. Invasive *Streptococcus anginosus* group infection—does the species predict the outcome? *Int J Infect Dis* 2014;18:38–40. doi:10.1016/j.ijid.2013.09.003.
- [72] Whiley RA, Beighton D, Winstanley TG, Fraser HY, Hardie JM. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group): association with different body sites and clinical infections. *J Clin Microbiol* 1992;30:243–4.
- [73] Hurley R, Douglas C, Montgomery J, Clark L. The hidden cost of deep neck space infections. *Ann R Coll Surg Engl* 2017:1–6. doi:10.1308/rcsann.2017.0193.