

Téma P 02-03: Diagnostika streptokoků, enterokoků a G+ tyčinekK nastudování: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Corynebacterium* s (z učebnic, internetu...)

Z jarního semestru: Mikroskopie, Kultivace, Biochemická identifikace, Neutralizace

Tabulka pro souhrn výsledků úkolů 1 až 6 (k postupnému vyplnění):

Kmen	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	U	V	W
Gramovo barvení – Úkol č. 1												
Kultivace – úkol 2 (pište jen základní charakteristiku)												
Kataláza – úkol 3a												
Slanetz-Bartley 3b												
Žluč-eskulin 3c												
Úkol 4a: Optochin (jen viridující str.)												
Úkol 4b: Streptotest 16 (jen ústní strep.)												
Úkol 5a: PYR test (jen hemolytické s.)												
Úkol 5b: CAMP (jen hemolytické s.)												
Úkol 5c (jen nAnB) Aglutinace												
Úkol 8: arabinóza												
Úkol 9: Růst na KA při 4 °C												
KONEČNÝ ZÁVĚR												

Úkol č. 1: Mikroskopie podezřelých kmenů

Na stole máte kmeny označené písmeny. Obarvíte je podle Grama a rozlišíte gram pozitivní koky a tyčinky a gram negativní bakterie. U gram pozitivních tyčinek si také všimnete uspořádání (palisády), velikosti (drobné, robustní), případně sporulace. Nátěry jednotlivých kmenů označte na sklíčku pomocí dermatografu příslušným písmenem. Výsledky zapište do tabulky. S gram negativní tyčinkou již dále nepracujte.

Úkol č. 2 Kultivace na krevním agaru

Na miskách s krevním agarom máte všechny kmeny. Zapište vlastnosti kmenů do tabulky jen nejnápadnější znaky (velikost, barva a především úplná hemolýza / částečná / viridace / nepřítomnost hemolýzy)

Úkol č. 3: Základní kultivační a biochemické testy – rodové určení**a) Katalasový test k odlišení stafylokoků**

Proveďte katalasový test se všemi kmeny z prvního úkolu s výjimkou toho, který jste v tomto úkolu vyřadili. Stafylokoky jsou katalasa pozitivní, streptokoky a enterokoky negativní. Zapište do tabulky.

b) Růst na Slanetz-Bartleyově agaru k odlišení enterokoků

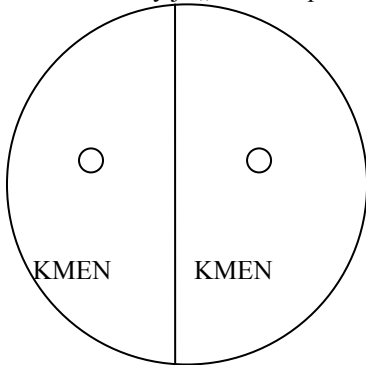
Na misce máte po výsečích naočkovány všechny kmeny. Rostou však jen dva - enterokoky. Zapište výsledek do tabulky.

c) Růst na žluč-eskulinovém agaru k odlišení enterokoků a listerií

Na misce máte po výsečích naočkovány všechny kmeny. Rostou však jen tři. V případě G+ koků platí, že tyto kmeny patří mezi enterokoky. U G+ tyčinek by mělo jít o listerii. Zapište výsledek do tabulky.

Úkol č. 4 Bližší určení streptokoků s viridací**a) Optochinový test**

Máte za úkol vyhodnotit optochinový test u dvou kmenů, které jste určili jako streptokoky s viridací. Optochinový test je test, který se ničím neliší od běžného difúzního diskového testu až na to, že účinná látka (optochin) se nyní už nevyužívá léčebně. Kmen s přítomností zóny inhibice růstu kolem disku je *S. pneumoniae*, kmen bez zóny je „ústní streptokok“. Výsledek zakreslete a zapište do tabulky (tam stačí ve formě + / –)

**b) Biochemické určení „ústního“ streptokoka**

V tomto praktiku se neprovádí. Viz výklad učitele.

Úkol č. 5 Určování streptokoků s částečnou či úplnou hemolýzou

Tento úkol provádějte u tří kmenů, které jste určili jako streptokoky s betahemolýzou (části a, b, c); poslední část pouze u kmene, který určíte jako non-A-non-B streptokoka.

a) PYR test

PYR test je proužkový test, podobný oxidázovému. Při odečítání barevné reakce je však nutno asi pět minut vyčkat, pak přikápnout kapku činidla pro PYR test a poté počkat další půlminutu. Pozitivní je zčervenání otisku. Také tento test je pozitivní u *S. pyogenes* (a také u enterokoků). Negativní je *Streptococcus agalactiae* i non-A-non-B streptokoky.

Poznámka: Někdejší bacitracinový test se dříve používal místo PYR-testu. Jeho princip je shodný s principem optochinového testu, jen s jiným antibiotikem. Pro nedostatečnou specifitu byl již téměř opuštěn.

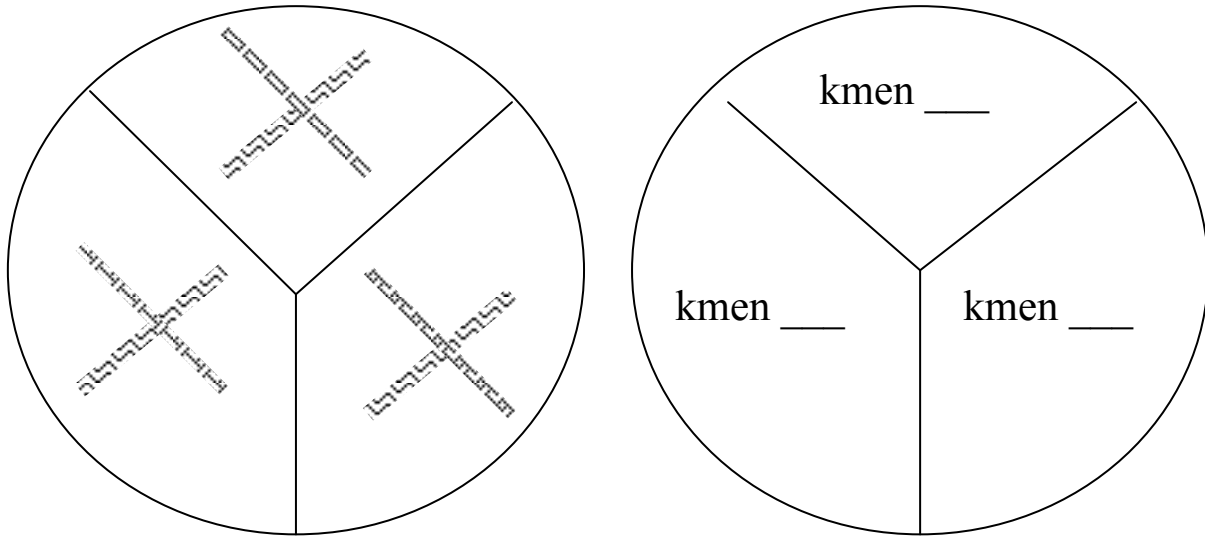
Vyplňte následující tabulku, včetně zakreslení výsledku PYR testu u všech tří testovaných kmenů.

Kmen (zapište písmeno)	Kmen (zapište písmeno)	Kmen (zapište písmeno)
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Interpretace: negativní – pozitivní	Interpretace: negativní – pozitivní	Interpretace: negativní – pozitivní

b) CAMP test

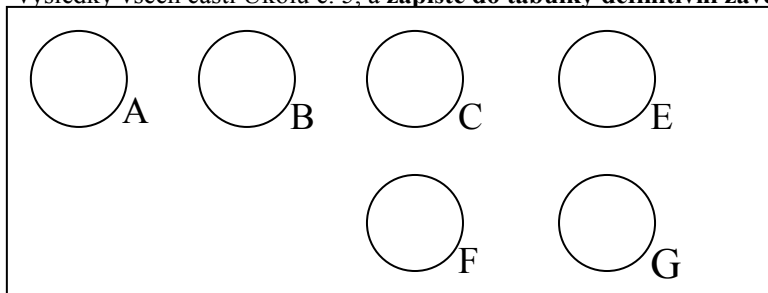
Poznámka: CAMP test nemá nic společného s cyklickým adenosinmonofosfátem. Nazývá se podle jmen svých objevitelů. Proto se také píše CAMP test a nikoli cAMP test.

CAMP test je založen na hemolytickém synergismu mezi kmenem *S. aureus* produkujícím beta-haemolysin a kmenem *S. agalactiae* strain. Pozitivní výsledek má tvar dvou trojúhelníkovitých zón („motýlovitý tvar“) úplné hemolýzy v místě překřížení obou kmenů. Malá zóna jiného tvaru se považuje za negativní výsledek. Negativní je jak *S. pyogenes*, tak i non-A-non-B streptokoky. Nakreslete svůj výsledek do obrázku (na následující stránce):



c) Demonstrace aglutinačního testu k bližšímu určení zejména non-A-non-B streptokoků

U kmene určeného jako streptokok non-A-non-B by se mohlo provést určení séroskupiny aglutinací. Prohlédněte si na obrázku z dataprojekce výsledek takové aglutinace a zakreslete. Poté zaznamenejte do tabulky výsledky všech částí Úkolu č. 5, a **zapište do tabulky definitivní závěr (určení jednotlivých streptokoků).**



Úkol č. 6 Testy citlivosti na antibiotika u streptokoků

Vyhodnoťte testy citlivosti (difusní diskové testy) na antibiotika u těch kmenů streptokoků, které považujete za patogeny či možné patogeny; předpokládejme pro jednoduchost, že se jedná o kmeny z horních cest dýchacích. Do tabulky dopište zkratky antibiotik dle přiložené kartičky a pro všechny testované kmeny změřte zóny citlivost v mm. Na kartičce jsou napsány hraniční zóny – podle nich interpretujte zóny vámi zjištěné jako citlivé (C), rezistentní (R) a dubiózní (D). Dubiózní jsou zóny, jejichž průměr právě odpovídá referenční zóně.

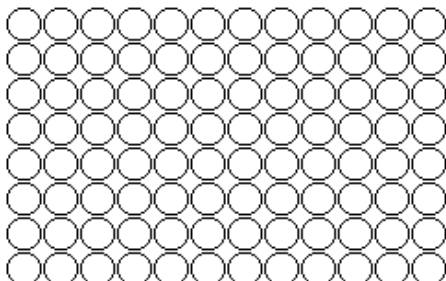
Kmen →								
Antibiotikum (celý název)	Ø zóny (mm)	Interpr.	Ø zóny (mm)	Interpr.	Ø zóny (mm)	Interpr.	Ø zóny (mm)	Interpr.

Úkol č. 7 Diagnostika pozdních následků streptokokových infekcí – vyšetření ASLO

Na bočním stole naleznete ve vlhké komůrce destičku. Obsahuje pozitivní kontrolu a séra pacientů. Určete titry a interpretujte z hlediska rizika. (Přesné provedení bylo popsáno v jarním semestru při probírání neutralizace).

Výsledek:

Interpretace výsledku:



Úkol č. 8: Vzájemné rozlišení enterokoků

a) Arabinózový test pro druhové rozlišení dvou nejběžnějších druhů enterokoků

Proveďte dva kmeny, které byly určeny jako enterokoky. Prohlédněte si zkumavky s výsledkem arabinózového testu. Žlutá barva znamená pozitivitu (typická pro *Enterococcus faecium*) a zelená negativitu (typická pro *Enterococcus faecalis*). Výsledek zapište do tabulky na první straně.

b) Biochemický test k druhovému rozlišení enterokoků ze závažných klinických materiálů (je schopen najít více než ony dva nejdůležitější druhy)

V závažných případech raději použijeme spolehlivější druhové určení než je orientační určení arabinosovým testem ve zkumavce. Použijeme biochemický test v plastové destičce, v našich podmínkách nejčastěji EN-COCCUSTest. V tomto praktiku se neprování, měli byste však vzít na vědomí jeho existenci (může být předmětem zkoušení např. při zápočtovém testu).

Úkol č. 9 Další metody k diagnostice listerií

a): Růst listerií při 4 °C

Prohlédněte si kmen, který jste předběžně určili jako listerii, a který byl kultivován při chladničkové teplotě. Zapište výsledek testu (roste – neroste) do tabulky.

b): Demonstrace růstu *Listeria monocytogenes* na chromogenní půdě

Prohlédněte si obrázek nárůstu listerií na chromogenní půdě. Půda je specifická pouze pro tento druh. V klinické mikrobiologii se chromogenní půdy pro listerie příliš nevyužívají, mají však velký význam v potravinářství.

Výsledek: Na půdě s názvem _____ má *L. monocytogenes* kolonie barvy _____

Poznámka: Z praktických a časových důvodů vynecháváme testování citlivosti u enterokoků a listerií. Difusní diskový test se odečítá podobně jako u jiných bakterií. U enterokoků na MH, u G+ tyčinek zpravidla na MH s krvinkami.

Kontrolní otázky:

1. Který streptokok je uspořádán ve dvojicích a jaký tvar jeho koky mají?
2. Který streptokok má pozitivní PYR test? A který celý rod G+ koků jej má pozitivní?
3. Provádí se druhové určení ústních streptokoků rutinně? Kdy má význam?
4. Proč se optochinový test (ale i normální difusní diskové testy) provádí na agaru MH s krví a ne na běžném MH agaru?
5. Lze použít CAMP test v diagnostice zlatého stafylokoka? Zdůvodněte.
6. Proč se u betahemolytických streptokoků k druhovému určení zpravidla nevyužívá biochemických testů?
7. U kterých streptokoků připadají v úvahu pozdní následky a o jaké následky se především jedná?
8. Které streptokoky způsobují infekce s kožními projevy? O jaké infekce jde?
9. Které grampozitivní tyčinky jsou sporulující? Jsou spóry vždy viditelné?
10. Co jsou to VRE a proč nás zajímají?
11. Co jsou to metachromatická granula a jaký význam má (či spíše mělo) jejich barvení v diagnostice záškrtu?
12. Jaké je využití *Bacillus stearothermophilus* a *Bacillus subtilis* v lékařské mikrobiologii? (Viz J05)