

**Téma P02-03: Diagnostika streptokoků, enterokoků a G+ tyčinek**K nastudování: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Corynebacterium* (z učebnic, internetu...)

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

**Tabulka pro souhrn výsledků úkolů 1 až 5 a 8 až 9 (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 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												
<b>KONEČNÝ ZÁVĚR</b>												

**Úkol 1: Mikroskopie podezřelých kmenů**

Na stole máte kmeny označené písmeny. Obarvíte je podle Grama a rozlišíte grampozitivní koky a tyčinky a gramnegativní bakterie. U grampozitivních 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 gramnegativní tyčinkou již dále nepracujte.

**Úkol 2: Kultivace na krevním agaru**

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

**Úkol 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. Z G+ tyčinek jsou pozitivní korynebakteria, listerie i bacily (avšak např. arkanobakteria by byla 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.

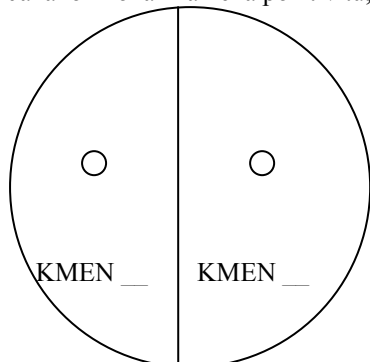
**c) Růst na žluč-eskulinovém agaru k odlišení enterokoků a listerií**

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 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 + / –) Jakákoli zóna znamená pozitivitu, absence zóny je negativní. Zónu není třeba měřit.



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

V tomto praktiku se neprovádí. Vizte výklad učitele. (Odečítání je velmi podobné STAPHYtestu 16 z P01)

#### Úkol 5: Určování streptokoků s částečnou či úplnou hemolýzou

Tento úkol provádějte u tří kmenů, které jste určili jako streptokoky s úplnou nebo částečnou hemolýzou (části a, b); část c) 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.*

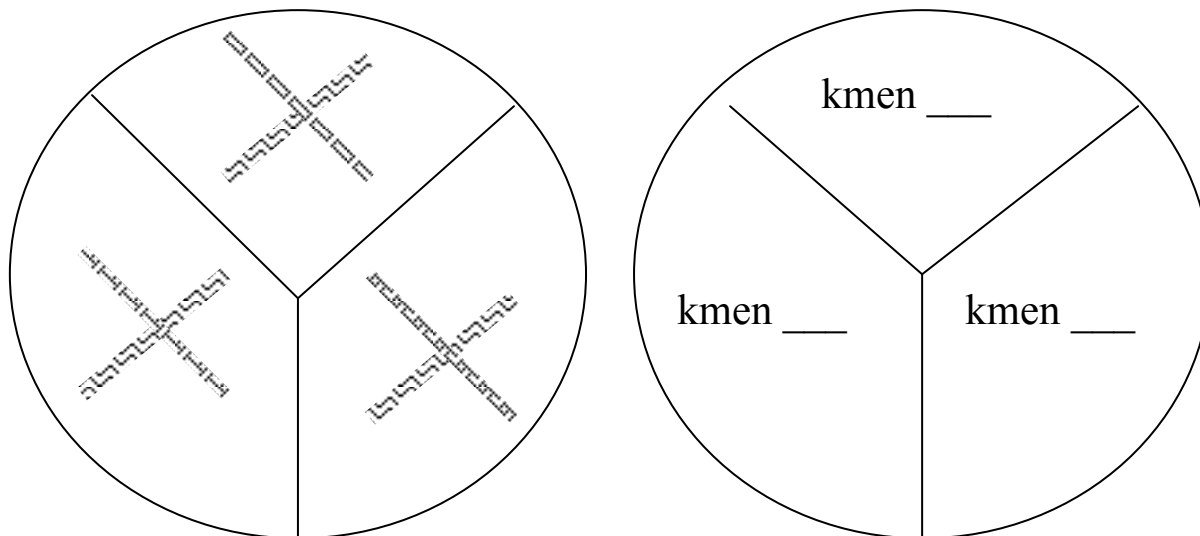
Vyplňte následující tabulku, včetně zakreslení výsledku PYR testu u všech tří testovaných kmenů.

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

##### 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-hemolysin a kmenem *S. agalactiae*. 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 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. U kmene určeného jako non-A-non-B streptokok pro jeho malou patogenitu citlivost neurčujeme; u kmene určeného jako *S. agalactiae* (typický původce močových infekcí) použijeme sadu antibiotik určenou pro léčbu močových infekcí (obsahuje např. nitrofurantoin).

Ve spojeném zubním praktiku se odečítá pouze test citlivosti na *Streptococcus pyogenes*.

Interpretujte kmeny jako citlivé (C), intermediární (I) či rezistentní (R) k daným antibiotikům.

Kmen →				L		S	
Antibiotikum	Citlivý pokud je	Intermediární pokud	Rezistentní	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace
Penicilin P	≥ 18 mm	<del>18–20 mm</del>	< 18 mm			v tomto praktiku se neprovádí	
Erythromycin E	≥ 21 mm	18–20 mm	< 18 mm				
Clindamycin DA	≥ 17 mm	<del>18–20 mm</del>	< 17 mm				
Chloramfenikol C	≥ 19 mm	<del>18–20 mm</del>	< 19 mm				
Tetracyklin* TE	≥ 23 mm	20–22 mm	< 20 mm				
Vankomycin VA	≥ 13 mm	<del>18–20 mm</del>	< 13 mm				

Kmen →				P	
Antibiotikum	Citlivý pokud je	Intermediární pokud	Rezistentní	Ø zóny (mm)	Interpretace
Penicilin p*	≥ 18 mm	<del>18–20 mm</del>	< 18 mm	v tomto praktiku se neprovádí	
Tetracyklin* TE	≥ 23 mm	20–22 mm	< 20 mm		
Vankomycin VA	≥ 13 mm	<del>18–20 mm</del>	< 13 mm		
Nitrofurantoin F	≥ 15 mm	<del>18–20 mm</del>	< 15 mm		

\*interpretuje se jako ampicilin

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

**Princip – opakování z J07:** Protilátky brání hemolyzinu (streptolysin O – antigen) hemolyzovat králičí erythrocyty. Hladina ASLO se zvyšuje po nálezích vyvolaných hemolytickými streptokoky skupiny A (méně často i jiných skupin). Riziko pozdních následků streptokokových nálezích se projeví zvýšením ASLO nad 200 m. j. (mezinárodních jednotek).

Na bočním stole naleznete ve vlhké komůrce destičku. Obsahuje pozitivní kontrolu a několik sér pacientů. Určete hodnoty ASLO (hodnota ASLO odpovídá poslednímu ještě pozitivnímu dílku; pozitivita = zábrana hemolýzy, negativita = hemolýza) a interpretujte z hlediska rizika pozdních následků streptokokové infekce.

	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911	ASLO v m. j.	Interpretace
K+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		

### Úkol 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 arabinózovým testem ve zkumavce. Použijeme biochemický test v plastové destičce, v našich podmínkách nejčastěji EN-COCCUStest. V tomto praktiku se neprovádí, měli byste však vzít na vědomí jeho existenci (může být předmětem zkoušení např. při zápočtovém testu). Odečítá se podobně jako STAPHYtest 16 z P01, obsahuje však jen jeden řádek, a proto je jeho odečítání jednodušší.

### Úkol 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, korynebakterií a listerií. Difusní diskový test se odečítá podobně jako u jiných bakterií. U enterokoků na MH, u G+ tyčinek zpravidla na MH s krivkami.

Slovníček k dnešnímu tématu:

V tomto protokolu (a v některých učebnicích)	V některých jiných učebnicích
viridace	alfa-hemolýza
částečná hemolýza	beta-hemolýza
úplná hemolýza	
žádná hemolýza/nepřítomnost hemolýzy	gama-hemolýza