

Téma P02-03: Diagnostika streptokoků, enterokoků a G+ tyčinekK 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 | | | | | | | | | | | | |
| KONEČNÝ ZÁVĚR | | | | | | | | | | | | |

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.

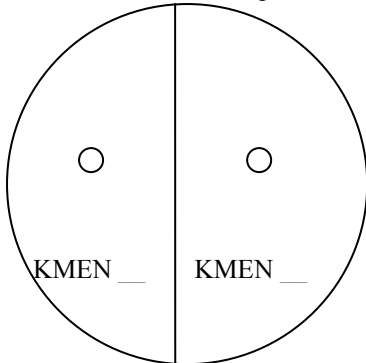
c) Růst na žluč-eskulinovém agaru k odlišení enterokoků a listerií

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.

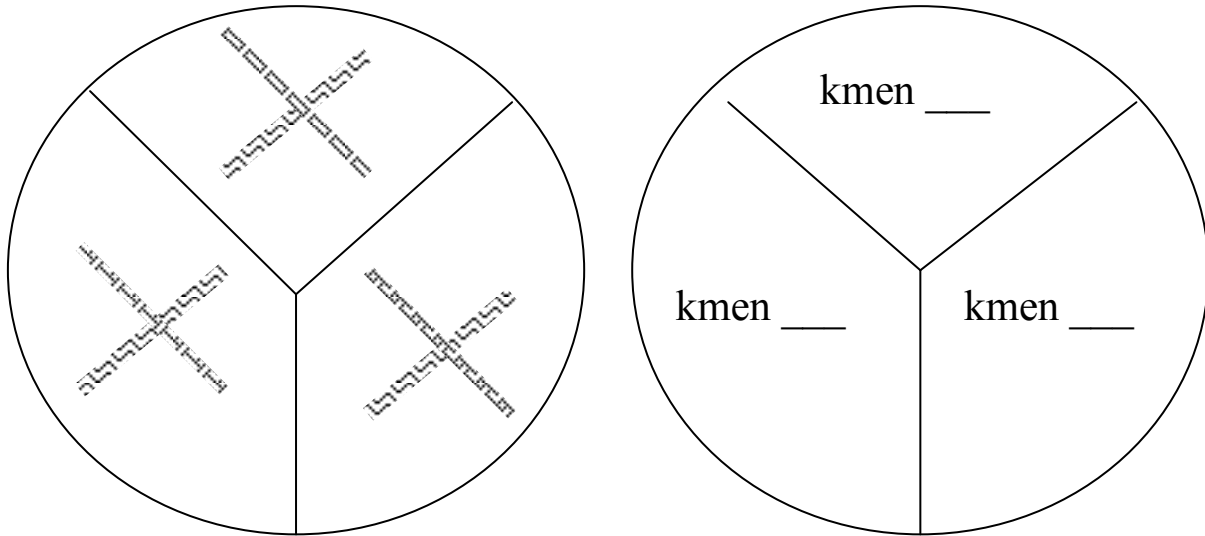
Vyplňte následující tabulku, včetně zakreslení výsledku PYR testu u všech tří testovaných kmenů.

| 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

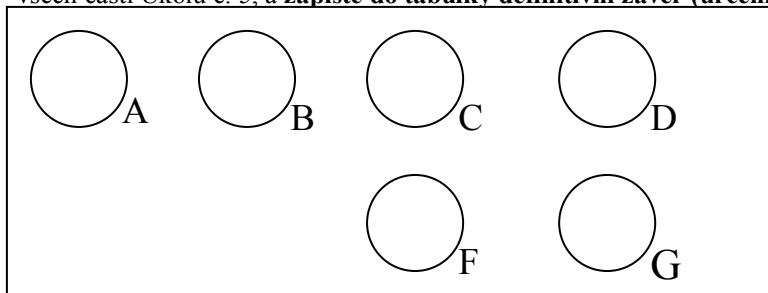
Poznámka: CAMP test nemá nic společného s cyklickým adenosinmonofosfátem. Nazývá se podle jmen svých objevitelů. Proto se také píše CAMP test a nikoli cAMP test.

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).

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

| Antibiotikum | Kmen → | | | Ø zóny (mm) | Interpretace | Ø zóny (mm) | Interpretace |
|------------------|------------------|---------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | Citlivý pokud je | Intermediární pokud | Rezistentní | | | | |
| Penicilin P | ≥ 18 mm | 18–20 mm | < 18 mm | | | | |
| Erythromycin E | ≥ 21 mm | 18–20 mm | < 18 mm | | | | |
| Clindamycin DA | ≥ 17 mm | 18–20 mm | < 17 mm | | | | |
| Chloramfenikol C | ≥ 19 mm | 18–20 mm | < 19 mm | | | | |
| Tetracyklin* TE | ≥ 23 mm | 20–22 mm | < 20 mm | | | | |
| Vankomycin VA | ≥ 13 mm | 18–20 mm | < 13 mm | | | | |

| Kmen → | | | | Ø zóny (mm) | Interpretace |
|------------------|------------------|---------------------|-------------|-------------|--------------|
| Antibiotikum | Citlivý pokud je | Intermediární pokud | Rezistentní | | |
| Penicilin P* | ≥ 18 mm | X | < 18 mm | | |
| Tetracyklin* TE | ≥ 23 mm | 20–22 mm | < 20 mm | | |
| Vankomycin VA | ≥ 13 mm | X | < 13 mm | | |
| Nitrofurantoin F | ≥ 15 mm | X | < 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 nákazách vyvolaných hemolytickými streptokoky skupiny A (méně často i jiných skupin). Riziko pozdních následků streptokokových nákaz 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 důlku; 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 запиšte 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 krvinkami.

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 |