**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 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **KONEČNÝ ZÁVĚR** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

## Úkol 1: Mikroskopie podezřelých kmenů

Na stole máte kmeny označené písmeny. Obarvěte je podle Grama a rozlište grampozitivní koky a tyčinky a gramnegativní bakterie. U grampozitivních tyčinek si také všimněte uspořádání (palisády), velikosti (drobné, robustní), případně sporulace. Nátěry jednotlivých kmenů označte na sklíčku pomocí dermografu 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. Zapište do tabulky.

**Poznámka:** Testování katalázy u G+ tyčinek se může zdát zbytečné, protože *Listeria, Corynebacterium* i *Bacillus* jsou v testu pozitivní. Ovšem některé jiné koryneformní tyčinky (např. *Arcanobacterium*) jsou negativní, a proto má kataláza v diagnostice G+ tyčinek své místo.

## 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.

KMEN \_\_

KMEN \_\_

### 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 specificitu 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) |
|  |  |  |
| Interpretace: negativní – pozitivní  *nehodící se škrtněte* | Interpretace: negativní – pozitivní  *nehodící se škrtněte* | Interpretace: negativní – pozitivní  *nehodící se škrtněte* |

## 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-hemolyzin 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):

kmen \_\_\_

kmen \_\_\_

kmen \_\_\_

## 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).

G

F

D

C

B

A

## 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.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Kmen 🡪 | | | |  | |  | |
| Antibiotikum | Citlivý pokud je | Intermedi-ární pokud | Rezis-tentní | ∅ zóny (mm) | Interpre-  tace | ∅ zóny (mm) | Interpre-  tace |
| Penicilin  P | ≥ 18 mm |  | < 18 mm |  |  |  |  |
| Erythromycin  E | ≥ 21 mm | 18–20 mm | < 18 mm |  |  |  |  |
| Clindamycin  DA | ≥ 17 mm |  | < 17 mm |  |  |  |  |
| Chloramfenikol  C | ≥ 19 mm |  | < 19 mm |  |  |  |  |
| Tetracyklin\*  TE | ≥ 23 mm | 20–22 mm | < 20 mm |  |  |  |  |
| Vankomycin  VA | ≥ 13 mm |  | < 13 mm |  |  |  |  |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Kmen 🡪 | | | |  | |
| Antibiotikum | Citlivý pokud je | Intermedi-ární pokud | Rezis-tentní | ∅ zóny (mm) | Interpre-  tace |
| Penicilin  P\* | ≥ 18 mm |  | < 18 mm |  |  |
| Tetracyklin\*  TE | ≥ 23 mm | 20–22 mm | < 20 mm |  |  |
| Vankomycin  VA | ≥ 13 mm |  | < 13 mm |  |  |
| Nitrofurantoin  F | ≥ 15 mm |  | < 15 mm |  |  |

\*interpretuje se jako ampicilin

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

***Princip – opakování z J07:*** *Protilátky brání hemolyzinu (streptolyzin O – antigen) hemolyzovat králičí erytrocyty. 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.

## ASLO CZ

## Úkol 8: Vzájemné rozlišení enterokoků

## a) Arabinózový test pro druhové rozlišení dvou nejběžnějších druhů enterokoků

## Prověřte 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) MALDI-TOF pro přesnější diagnostiku enterokoků a koryneformních tyčinek

*Ačkoli arabinózový test lze považovat za dostatečný pro běžné případy, v některých situacích potřebujeme diagnostiku založenou na více znacích a schopnost detekovat více než dva druhy enterokoků. Podobně termín "koryneformní tyčinky" obvykle představuje dostatečnou úroveň určení korynebakterií a příbuzných bakterií (zejména pokud jsou izolovány z kůže), ale ne pro důležité izoláty (například z krevního oběhu).*

*Jak pro enterokoky, tak i pro koryneformní tyče je možné použít některé biochemické testy. Test na Enterococcus je vyráběn i v Česku ("EN-COCCUStest firmy Erba Lachema"), ale neexistuje žádný test Lachema pro koryneformní tyčinky, takže by bylo zapotřebí použít jiné testy (například API® Coryne od firmy Bio-Mérieux).*

*V poslední době je také možné oba nahradit metodou MALDI-TOF****.***

Ve dvojitém praktiku se úkol neprovádí.

## 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 |