

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 nejvýraznější 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.

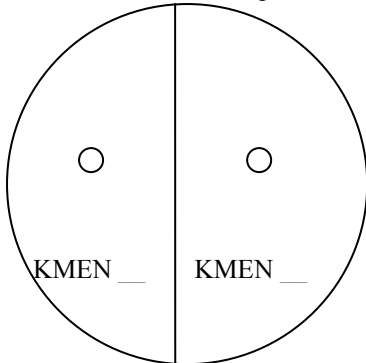
c) Růst na žluč-eskulinovém agaru k odlišení enterokoků a listerií

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.



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.

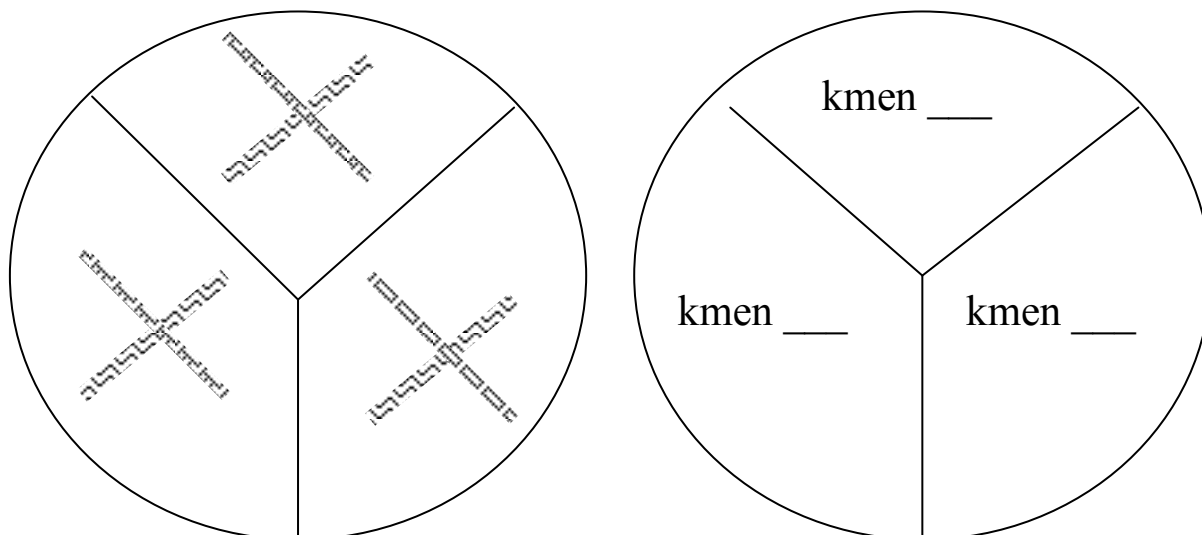
Vyplňte následující tabulku, včetně zakreslení výsledku PYR testu u všech tří testovaných kmenů.

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

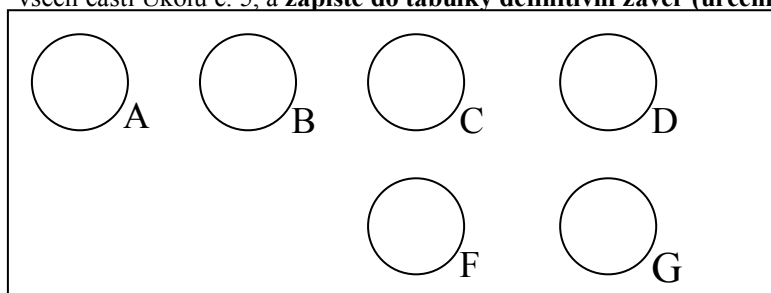
Poznámka: CAMP test nemá nic společného s cyklickým adenosinmonofosfátem. Nazývá se podle jmen svých objevitelů. Proto se také píše CAMP test a nikoli cAMP test.

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.

Kmen →							
Antibiotikum	Citlivý pokud je	Intermediární pokud	Rezistentní	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace
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 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-COCUStest 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