

Téma PZ03: Dg. některých dalších grampozitivních bakterií (enterokoků, listerií, korynebakterií, bacilů)

K nastudování: *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Corynebacterium* (ze skript, učebnic, internetu). Z jarního semestru: Mikroskopie, Kultivace, Biochemická identifikace

Tabulka pro hlavní výsledky úkolů číslo 1 až 5 (k postupnému vyplnění):

Kmen		K	L	M	N	P	Q	R	S
Gramovo barvení – Úkol 1									
Úkol 2 Kulti- vace (krevní agar)	Velikost								
	Barva								
	Tvar								
	Profil								
	Změny agaru								
	Jiné								
Katalázový test Úkol 3a									
Slanetz-Bartley Úkol 3b									
Žluč-eskulinová půda Úkol 3c									
Arabinózový test Úkol 4a									
MALDI TOF Úkol 4b									
Růst v ledničce Úkol 5a									
DEFINITIVNÍ ZÁVĚR*									

*U *Bacillů* a *Listerií* napište pouze rodové jméno. Druhové určení by vyžadovalo přesnější testy, které nemohou být v praxi provedeny.

Úkol 1: Mikroskopie podezřelých kmenů

Na stole máte písmeny popsané kmeny. Obarvěte je podle Grama a výsledky zanepte do tabulky. Nezapomeňte na důležité detaily („tyčinky v palisádách“, „robustní, sporulující tyčinky“ a podobně). Aby nedošlo k záměně, popište sklíčka dermatografem. Další úkoly budeme provádět pouze s grampozitivními bakteriemi.

Úkol 2: Morfologie kolonií G+ koků a tyčinek

Popište kolonie jako obvykle. V popisu vynechte gramnegativní bakterie, ale prohlédněte si je pro srovnání. U kmenů, které jste identifikovali jako G+ tyčinky, se pokuste uhádnout, o jakou bakterii by mohlo jít, podle následující charakteristiky:

Bacillus – velké, ploché, suché, plst'ovité kolonie, „rozlézající“ se po povrchu agaru, někdy s výraznou hemolýzou, jindy zcela bez ní. Mikroskopicky velmi robustní tyčinky, někdy s nálezem centrálně až subterminálně uložených endospór, jež mohou, ale nemusí bubřit tyčinku.

Listeria – bezbarvé až nažedlé kolonie, velmi podobné enterokokovým, bez hemolýzy nebo s hemolýzou, mikroskopicky drobnější než *Bacillus*, neuspořádané v palisádách, ale spíše v krátkých řetízích.

Corynebacterium (a blízké rody) – šedavé nebo bělavé kolonie podobné stafylokokovým, ale někdy i o hodně menší, většinou bez hemolýzy; v mikroskopii spíše menší než předchozí, ale kyjovité a uspořádané do palisád.

Úkol 3: Některé běžné biochemické a kultivační testy

a) Katalázový test

Proveďte katalázový test pro všechny kmeny, které jsou G+.

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-Bartleyho půdě

Na misce máte naočkované tytéž kmeny jako v úkolu 1. Pozitivní jsou ty, které nejen rostou, ale navíc mají typickou růžovou až červenohnědou barvu. Na této půdě rostou pouze enterokoky. Výsledek zapište do tabulky.

c) Růst na žluč-eskulinové půdě

Na rozdíl od předchozí umožňuje žluč-eskulinová půda nejen růst rodu *Enterococcus* (to umožňuje rozlišit jej mezi G+ koky), ale také *Listeria* (diagnostická mezi G+ tyčinkami). V pozitivním případě vidíte černé kolonie. Zapište výsledek do tabulky.

Úkol 4: 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*).

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.*

Odečtěte výsledky MALDI-TOF u tří z vašich kmenů (dva enterokoky a jedna koryneformní tyčinka).

Napište výsledky do tabulky a odpovězte na následující otázku:

Do jaké úrovně jsou kmeny určeny pomocí MALDI-TOF? Podtrhněte, co platí:

První enterokok, tzn. kmen ____ (napište písmeno) je určen na úroveň (podtrhněte nebo zakroužkujte):

jisté určení druhu – pravděpodobné určení druhu – jisté určení rodu – neurčeno

Druhý enterokok, tzn. kmen ____ (napište písmeno) je určen na úroveň (podtrhněte nebo zakroužkujte):

jisté určení druhu – pravděpodobné určení druhu – jisté určení rodu – neurčeno

Koryneformní tyčinka, tzn. kmen ____ (napište písmeno) je určena na úroveň (podtrhněte nebo zakroužkujte):

jisté určení druhu – pravděpodobné určení druhu – jisté určení rodu – neurčeno

Úkol 5: 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

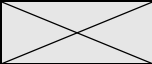
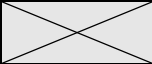
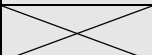
Prohlédněte si obrázek nárůstu listerií na chromogenní půdě. Půda je specifická pouze pro tento druh. V klinické mikrobiologii se chromogenní půdy pro listerie příliš nevyužívají, mají však velký význam v potravinářství.

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

Úkol 6: Vztah enterokoků a G+ tyčinek k antibiotikům**Úkol 6a: Testy citlivosti enterokoků a gram pozitivních tyčinek na antibiotika**

Na stole naleznete difusní diskové testy citlivosti na antibiotika u kmenů, které jste určili jako *Enterococcus faecalis* a *Listeria* sp. Test na *Enterococcus faecium* chybí, protože tato bakterie je často izolována ze stolice, kde testy citlivosti nejsou nutné. Nicméně nacházíme i kmeny z moče – viz úkol 6b. Nenaleznete ani test na *Corynebacterium* sp., mlčky předpokládáme, že náš kmen je původem z kůže a můžeme jej tedy považovat na součást normální mikroflóry. Také test na *Bacillus* sp. byste hledali marně – ve většině případů jsou bacily považovány za kontaminaci z prostředí a tudíž nebývají testovány.

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
Ampicilin AMP	≥ 10 mm	8–9 mm	< 8 mm				
Nitrofurantoin F	≥ 15 mm		< 15 mm				
Vankomycin VA	≥ 12 mm		< 12 mm				
Tetracyklin* TE	≥ 19 mm	15–18 mm	< 15 mm				
Q. + D.** QD	≥ 22 mm	20–22 mm	< 20 mm				
Gentamicin CN***	≥ 8 mm		< 8 mm				

*výsledek testu platí i pro doxycyklin

**quinupristin + dalfoopristin, kombinace dvou streptograminových antibiotik

***k léčbě enterokokových infekcí se hodí pouze v kombinaci s betalaktamy

Úkol 6b: Demonstrace testu citlivosti u kmene *Enterococcus faecium*

Na bočním stole můžete vidět test na *E. faecium*. Napište název antibiotika, které je lékem volby u infekcí způsobených *E. faecalis*, avšak z důvodu primární rezistence jej nelze použít u *E. faecium*: _____

Úkol 6c: Demonstrace kmene VRE

Na bočním stole nebo v prezentaci máte také kmen VRE. S použitím své paměti a/nebo jarních protokolů, napište, co znamená zkratka VRE: _____

Úkol 7: Demonstrace Elekova testu

Principem Elekova testu je precipitace mezi toxinem z toxického kmene a antitoxinem z papírového proužku, napuštěného antiserem. Jak toxin, tak i antitoxin difundují agarem. Studenti zubního lékařství tento úkol neprovádějí, mohou si však prohlédnout obrázek v prezentaci.