

Téma 1: Kultivace bakterií

K nastudování (z učebnic, internetu apod.): Pěstování bakterií

Úkol 1: Nejdůležitější půdy v klinické mikrobiologii a jejich charakteristika

Prohlédněte si vystavené půdy a poznamenejte si jejich typ a vlastnosti podle údajů na kartičkách nebo výkladu asistenta. Nezapomeňte si poznamenat, která půda je tekutá a která pevná a která je nalitá do zkumavky a která do Petriho misky.

Název půdy	Tekutá/pevná, miska/zkumavka	Barva	Typ půdy (selektivní, ...)	Bakterie, pro něž je půda určena*
1. bujon				
2. VL-bujon				
3. selenitový bujon				
4. Sabouraud				
5. Löwenstein-Jenssen				
6. KA				
7. Endo				
8. MH				
9. NaCl				
10. VLA				
11. XLD				
12. ČA				
13. Levinthal				
14. Slanetz-Bartley				

Úkol č. 2: Vliv fyzikálních a chemických podmínek na kultivaci bakterií**Závislost růstu bakterií na koncentraci solí a antibiotik**

Na stole máte misky s několika agarovými půdami; na každé z nich jsou naočkovány tři kmeny, každý na třetinu.

Zaznamenejte: ROSTE – NEROSTE

Kmen	Krevní agar (KA)	KA s NaCl (6,5 %)	KA s NaCl (10 %)	agar s azidem sodným (SB5)	KA s amikacinem
E – enterokok					
SR – streptokok					
ST – stafylokok					

Úkol 3: Krevní agar – viridace a hemolýza

Krevní agar lze považovat za půdu obohacenou (o krvinky), je však zároveň i půdou diagnostickou: můžeme na něm pozorovat následující typy změn:

úplná hemolýza – bakterie svou činností zcela rozloží erythrocyty ve svém okolí, krevní agar nabude barvy séra, je průhledný

částečná hemolýza – bakterie svou činností rozloží erythrocyty jen částečně, krevní agar kolem kolonií je pouze poloprůsvitný a jeho barva je nažloutlá (bez zeleného nádechu)

viridace (lat. *viridis* = zelený) – změna červeného krevního barviva na barvivo zelené, agar v okolí kolonie nabývá zelenavé barvy

žádná změna – většina bakterií krevní agar nemění

Zaznamenejte hemolytické vlastnosti tří kmenů na krevním agaru. Všimněte si zbarvení okolí kolonie, nikoli zbarvení kolonie samotné. Prohlížejte proti světlu.

<i>Streptococcus pyogenes</i> (SRPY)	
<i>Streptococcus agalactiae</i> (SRAG)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (SRPN)	
<i>Enterococcus faecalis</i> (ECFS)	

Téma 2: Diagnostika streptokokůK nastudování: *Streptococcus* (z učebnic, internetu...)**Tabulka pro souhrn výsledků úkolů 1 až 6 (k postupnému vyplnění):**

Kmen		K	L	M	N	P	Q	R	S
Gramovo barvení – Úkol 1									
Kataláza – úkol 2a									
Slanetz-Bartley úkol 2b									
Úkol 3 Kulti- vace (krevní agar)	Velikost								
	Barva								
	Tvar								
	Profil								
	Změny agaru								
	Jiné								
DÍLČÍ ZÁVĚR									
Úkol 4a: Optochin (jen viridující str.)									
4b: STREPTOtest 16 (jen ústní strep.)									
Úkol 5a: PYR test (jen hemolytické s.)									
Úkol 5b: CAMP (jen hemolytické s.)									
Úkol 5c (jen nAnB) Aglutinace									
KONEČNÝ ZÁVĚR									

Úkol 1: Mikroskopie podezřelých kmenů

Na stole máte kmeny označené písmeny. Obarvíte je podle Grama a určíte, který z nich není gram pozitivním kokem. Nátěry jednotlivých kmenů označíte na sklíčku pomocí tužky na sklo příslušným písmenem. Výsledky zapišete do tabulky. U kmenů, které nejsou G+ koky, proškrtněte zbylou část tabulky.

Úkol 2: Základní kultivační a biochemické testy – rodové určení**a) Katalázový test k odlišení stafylokoků**

Proveďte katalázový test se všemi kmeny z prvního úkolu s výjimkou toho, který jste v tomto úkolu vyřadili. Stafylokoky jsou katalasa pozitivní, streptokoky a enterokoky negativní. Zapišete do tabulky.

b) Růst na Slanetz-Bartleyově agaru k odlišení enterokoků

Na misce máte po výsečích naočkovány všechny kmeny. Roste však jen jeden. Tento kmen je enterokok, a není tedy streptokok. Zapišete výsledek do tabulky.

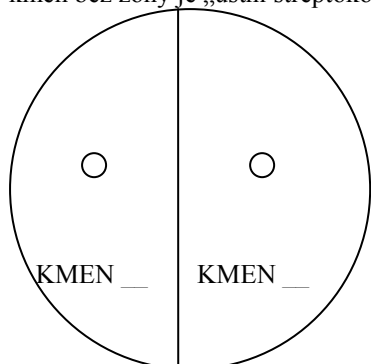
Úkol 3: Kultivace na krevním agaru

Na miskách s krevním agarem máte opět všechny kmeny. Ty, které jste vyloučili v úkolech 1 a 2, nemusíte popisovat, pro porovnání se však na ně podívejte. Zapišete vlastnosti kmenů do tabulky.

Nyní zapišete do tabulky „dílčí závěr“. Ke každému z kmenů K až S zapišete „NENÍ STR“ (není streptokok) „HEMOL STR“ (částečná či úplná hemolýza) nebo „VIRID STR“ (streptokok s viridací)

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 + / -)

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

U kmene, který jste v předchozím úkolu určili jako „ústního“ streptokoka, druhově vyhodnotíte biochemický mikrotest (STREPTOtest 16), využívající postupů, které znáte z jarního semestru.

Zkum.	První řádek s osmi jamkami									Druhý řádek s osmi jamkami							
	VPT	1H	1G	1F	1E	1D	1C	1B	1A	2H	2G	2F	2E	2D	2C	2B	2A
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
Kód:		Identifikace <i>Streptococcus</i>						% pravděpod.				T index					

Úkol 5: Určování streptokoků s částečnou či úplnou hemolýzou

Tento úkol provádějte u tří kmenů, které jste určili jako streptokoky s betahemolýzou (části a, b, c); poslední část 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.

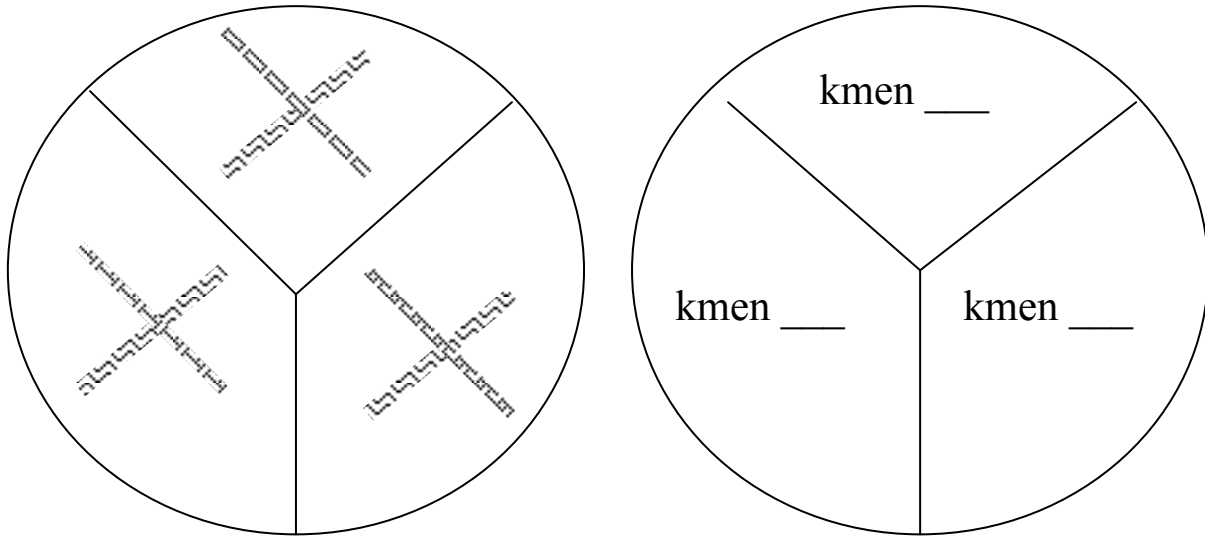
Vyplňte následující tabulku, včetně zakreslení výsledku PYR testu u všech tří testovaných kmenů.

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

b) CAMP test

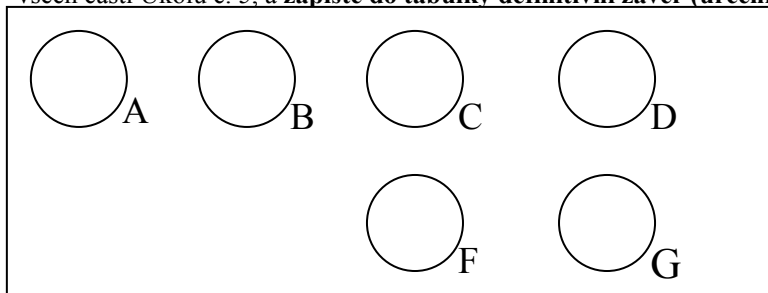
Poznámka: CAMP test nemá nic společného s cyklickým adenosinmonofosfátem. Nazývá se podle jmen svých objevitelů. Proto se také píše CAMP test a nikoli cAMP test.

CAMP test je založen na hemolytickém synergismu mezi kmenem *S. aureus* produkujícím beta-hemolysin a kmenem *S. agalactius*. 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. Do tabulky dopište zkratky antibiotik dle přiložené kartičky a pro všechny testované kmeny změřte zóny citlivosti v mm. Na kartičce jsou napsány hraniční zóny – podle nich interpretujte zóny vámi zjištěné jako citlivé (C), rezistentní (R) a dubiózní (D). Dubiózní jsou zóny, jejichž průměr právě odpovídá referenční zóně.

Kmen →								
Antibiotikum (celý název)	Ø zóny (mm)	Interpr.	Ø zóny (mm)	Interpr.	Ø zóny (mm)	Interpr.	Ø zóny (mm)	Interpr.

Úkol 7: Diagnostika pozdních následků streptokokových infekcí – vyšetření ASLO

Na bočním stole naleznete ve vlhké komůrce destičku. Obsahuje pozitivní kontrolu a séra 1 až 5. Určete titry a interpretujte z hlediska rizika. (Přesné provedení bylo popsáno v praktiku J08 při probírání neutralizace).

Na sérologické destičce odečtete stanovení hladiny ASLO u kontrolního séra a u pacientů.

	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911	ASLO v m. j.	Interpretace
K+	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		