

Téma P02: Diagnostika streptokokůK nastudování: *Streptococcus* (z učebnic, internetu...)

Mikroskopie, Kultivace, Biochemická identifikace, Neutralizace

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 Kultivace (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 kataláza 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

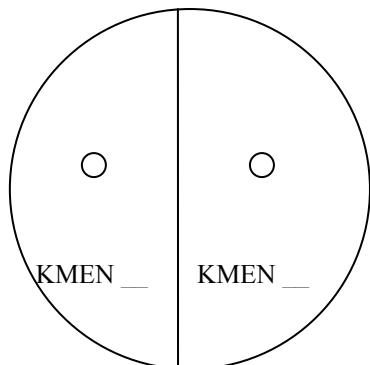
Na miskách s krevním agarem máte opět všechny kmeny. Ty, které jste vyloučili v úkolech 1 a 2, nemusíte popisovat, pro porovnání se však na ně podívejte. Zapišete vlastnosti kmenů do tabulky.

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: Blížejší 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 citlivosti (není nutno měřit) ■ = není zóna

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); poslední 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.

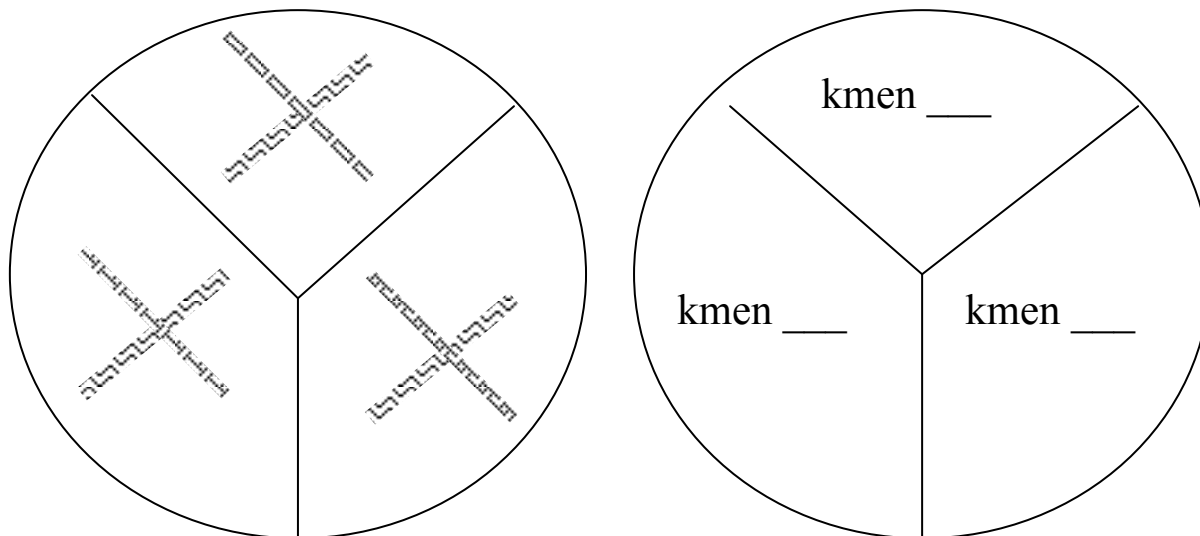
Vyplňte následující tabulku, včetně zakreslení výsledku PYR testu u všech tří testovaných kmenů.

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

b) CAMP test

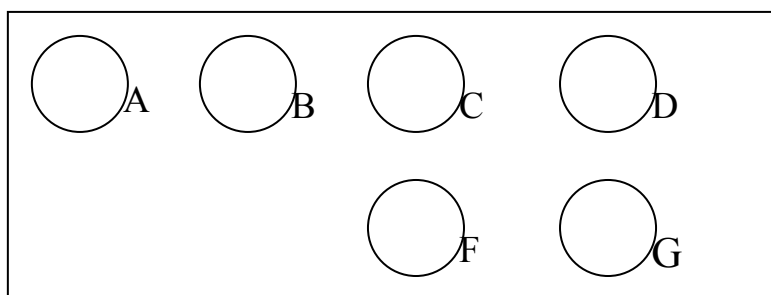
Poznámka: CAMP test nemá nic společného s cyklickým adenosinmonofosfátem. Nazývá se podle jmen svých objevitelů. Proto se také píše CAMP test a nikoli cAMP test.

CAMP test je založen na hemolytickém synergismu mezi kmenem *S. aureus* produkujícím beta-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).

Do tabulky dopište zkratky antibiotik dle přiložené kartičky a pro všechny testované kmeny změřte zóny citlivost 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.

Písmeno kmene →					Písmeno kmene →		
Antibiotikum	Ø zóny (mm)	Interpr.	Ø zóny (mm)	Interpr.	Antibiotikum	Ø zóny (mm)	Interpr.
Penicilin (P) (ref. zóna 18 mm)					Penicillin (P) (ref. zóna 18 mm)		
Erythromycin (E) (ref. zóna 21 mm)					Tetracyklin* (TE) (ref. zóna 23 mm)		
Klindamycin (DA) (ref. zóna 17 mm)					Vankomycin (VA) (ref. zóna 13 mm)		
Chloramfenikol (C) (ref. zóna 21 mm)					Nitrofurantoin (F) (ref. zóna 15 mm)		
Tetracyklin* (TE) (ref. zóna 23 mm)							
Vankomycin (VA) (ref. zóna 13 mm)							

*výsledek platí i pro doxycyklin

Úkol 7: Diagnostika pozdních následků streptokokových infekcí – vyšetření ASLO

Princip: Protilátky brání hemolyzinu (streptolysin O – antigen) hemolyzovat králičí erythrocyty. Hladina ASLO se zvyšuje po nálezích vyvolaných hemolytickými streptokoky skupiny A (méně často i jiných). Riziko pozdních následků streptokokových nálezích 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 dílku; 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	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		

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