

Téma P02: Kultivace – pokračování. Biochemická identifikace. Diagnostika streptokoků

K nastudování: *Streptococcus* (z učebnic, internetu...)

Z jarního semestru: 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 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) Agglutinace | | | | | | | | | |
| KONEČNÝ ZÁVĚR | | | | | | | | | |

Úkol 1: Mikroskopie podezřelých kmenů

Na stole máte kmeny označené písmeny. Obarvíte je podle Grama (postup byste měli znát nejspíše z minula) a určete, který z nich není gram pozitivním kokem. Nátěry jednotlivých kmenů označte na sklíčku pomocí tužky na sklo příslušným písmenem. Výsledky zapište 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. Připomeňme si, že substrátem je v tomto testu peroxid vodíku, pozitivita se projeví bublinkami, negativita jejich absencí. Zapište do tabulky.

b) Růst na Slanetz-Bartleyově agaru k odlišení enterokoků

Na misce máte po výsech naočkovány všechny kmeny. Roste však jen jeden. Tento kmen je enterokok, a není tedy streptokok. Slanetz-Bartleyho agar obsahuje azid sodný, který neumožňuje růst jiných bakterií, než jsou enterokoky. Stafylokoky zase rostou na půdě s 10 % NaCl. Streptokoky nerostou ani na jedné z těchto půd. Zapište výsledek do tabulky.

Úkol 3: Kultivace na krevním agaru

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

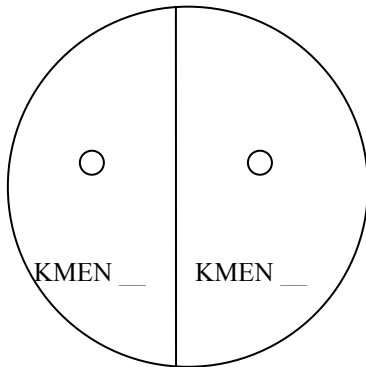
Na miskách s krevním agarem máte opět všechny kmeny. Ty, které jste vyloučili v úkolech 1 a 2, nemusíte popisovat, pro porovnání se však na ně podívejte. Zapište vlastnosti kmenů do tabulky.

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

Úkol 4: Blíže určeni 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

Pro urychlení a standardizaci identifikace bakterií se používají komerčně vyráběné identifikační soupravy. Bakterie jsou určovány do druhu na základě biochemických vlastností. V současné době existuje na trhu celá řada diagnostických souprav od nejrůznějších výrobců. V našich podmínkách jsou nejběžnější testy od firmy Erba Lachema, konkrétně si v tomto úkolu představíme STREPTOtest 16.

Provedení testu z časových důvodů nebudeme provádět, ale měli byste je znát: Připravíme bakteriální suspenzi tak, že rozmícháme několik kolonií ve zkumavce s fyziologickým roztokem. Naočkujeme 0,1 ml suspenze do všech jamek. Po inokulaci se k některým jamkám kápne parafinový olej, destička se vloží do polyethylenového sáčku a sáček se inkubuje v termostatu, u většiny běžných testů při 37 °C 24 hodin. Po inkubaci se často ještě do některých důlků přikápnou určité činidlo.

Vyhodnocení testu. Zhodnoťte biochemickou aktivitu kmene „ústního“ streptokoka a určete jej na úroveň druhu. Výsledky jednotlivých reakcí zapište do protokolu. Jako první odečtete výsledek ve zkumavce (VPT), pak reakce prvního a nakonec i druhého řádku ve dvojstripu. Kromě názvu mikroba zapište i procento pravděpodobnosti pro daný taxon a index typičnosti zkoumaného kmene. U nejednoznačných výsledků zapište všechny možné výsledky, případně se s pomocí asistenta pokuste o zhodnocení.

U kmene, který jste v předchozím úkolu určili jako „ústního“ streptokoka, druhově vyhodnoťte biochemický mikrottest (STREPTOtest 16).

| | 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.

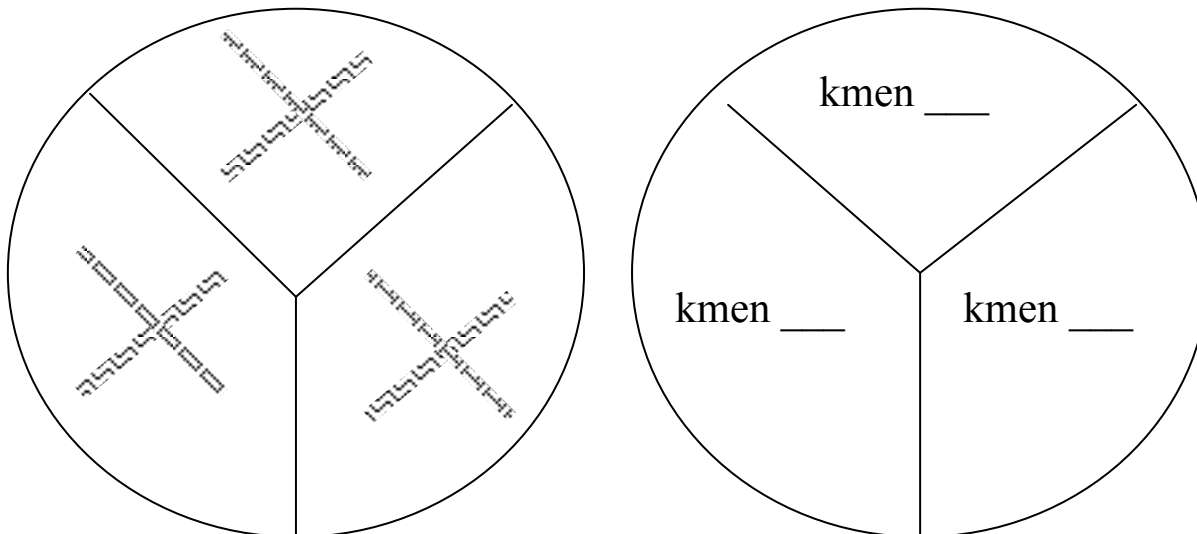
Vyplňte následující tabulku, včetně zakreslení výsledku PYR testu u všech tří testovaných kmenů.

| 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

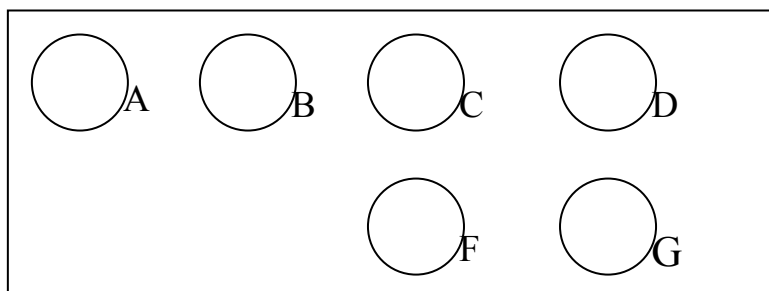
Poznámka: CAMP test nemá nic společného s cyklickým adenosinmonofosfátem. Nazývá se podle jmen svých objevitelů. Proto se také píše CAMP test a nikoli cAMP test.

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:



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 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 | Intermediární pokud | Rezistentní | Ø zóny (mm) | Interpretace |
| 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 7: Diagnostika pozdních následků streptokokových infekcí – vyšetření ASLO

Jde o zvláštní úkol, kdy nepátráme po bakteriích či jejich částech, ale místo toho pátráme po protilátkách proti nim. Zpravidla to činíme v případě, že chceme ověřit proběhlou protilátkovou odpověď a tím zjistit, že se tělo s mikrobem setkalo. V případě ASLO jde ale o trochu jiný případ – zvýšené množství protilátek indikuje autoimunitní reakci (tj. protilátky se „zvrhly“ a chybně reagují se strukturami vlastního těla.

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 projevuje 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 | | | | | | | | | | | | | | |

Úkol 8: Demonstrace dalších testů biochemické identifikace

Prohlédněte si a zakreslete příklady dalších testů, které se sice nepoužívají k diagnostice streptokoků, ale zato se s nimi setkáme v diagnostice jiných důležitých bakterií. Testy jsou pro ukázkou připraveny na bočním stole. Zakreslete si ukázky možných výsledků testů.

Úkol 8a: Příklad testu s diagnostickým proužkem: oxidázový test (důkaz produkce cytochromoxidázy)

Filtrační papírek na diagnostickém proužku napuštěný příslušným reagens přitiskněte na kolonie testovaného kmene. Proužek položte do víčka Petriho misky otisknutými koloniemi nahoru. Hodnocení reakce:

| | |
|--------------------|--|
| Pozitivní | do 30 s intenzivní modré zbarvení |
| Opožděně pozitivní | do 2 min intenzivní modré zbarvení |
| Negativní | beze změny nebo modrání až po uplynutí 2 min |

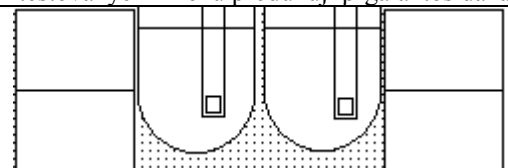
Zakreslete výsledky a interpretujte.

| | | |
|--------------------------|-------|--|
| <input type="checkbox"/> | Kmen: | |
| <input type="checkbox"/> | Kmen: | |

Úkol 8b: Důkaz produkce β -galaktosidázy – ONPG-test

Filtrační papírek na diagnostickém proužku napuštěný vhodným reagens (o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid) se vloží do suspenze připravené z kultury testovaného kmene. Inkubujeme v termostatu a výsledek reakce odečítáme po 4 hodinách. Reakce je pozitivní, pokud dojde k zežloutnutí suspenze.

Zapište, které z testovaných kmenů produkují β -galaktosidázu.

| | | |
|------------|--|------------|
| Kmen → |  | ← Kmen |
| Výsledek → | | ← Výsledek |

Úkol 8c: Tvorba sirovodíku, štěpení sacharidů a produkce plynů v půdě Hajnově

Tvorbu sirovodíku prokazujeme spolu se zkvašováním cukrů a produkcí CO₂ v kombinované půdě podle Hajny. Substrátem pro tvorbu H₂S je thiosulfát sodný a indikátorem citrát železitoamonný. Sirovodík vytvořený redukcí thiosulfátu reaguje s ionty železa za vzniku sulfidu železitého. Produkce H₂S se projeví zčernáním spodní části půdy. *S. Typhi* dělá jen uzoučký černý proužek na rozhraní šikmé části a plného sloupce.

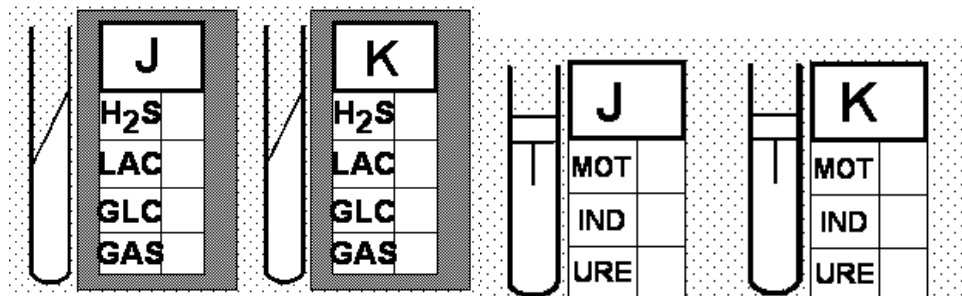
Podle pokynů vyučujícího zhodnoťte štěpení sacharidů a produkci plynů u testovaných kmenů. Výsledky zakreslete a zapište.

Úkol 8d: Průkaz pohyblivosti, tvorby indolu a štěpení močoviny (MIU)

K průkazu těchto vlastností se používá kombinovaná diagnostická půda MIU (motility, indol, urea). Zkoumané kmeny byly do půdy očkované vpichem. Pohyblivost bakterie se prozradí rozrůstáním z čáry vpichu. K průkazu indolu se přikapávají 2 kapky Kovácsova reagens – v pozitivním případě se na rozhraní půdy a činidla vytvoří červený prstenec. Pokud bakterie štěpí ureu, půda se alkalizuje a barví se do růžova.

K úkolu 8c:

K úkolu 8d:



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 |