

## Téma P03: Dg. některých dalších grampozitivních bakterií (enterokoků, listerií, korynebakterií, bacilů). Přehled přímého průkazu II

K nastudování: *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Corynebacterium* (ze skript, učebnic, internetu). Dále: 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 Kultivace (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									
ENCOCCUSTest Úkol 4b									
Růst v ledničce Úkol 5a									
<b>DEFINITIVNÍ ZÁVĚR*</b>									

\*U G+ tyčinek 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. U bakterií, které nebudou grampozitivní, neprovádějte další úkoly.

### Úkol 2: Morfologie kolonií G+ koků a tyčinek

Popište kolonie jako obvykle. V popisu vynechejte 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 našedlé 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+. Všimněte si, že *Listeria*, *Corynebacterium* i *Bacillus* jsou pozitivní, ovšem některé koryneformní tyčinky jiné než vlastní *Corynebacterium* (např. *Arcanobacterium*) jsou kataláza negativní.

#### 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) Biochemický test k druhovému rozlišení enterokoků ze závažných klinických materiálů (je schopen najít více než ony dva nejdůležitější druhy)

V závažných případech raději použijeme spolehlivější druhové určení než je orientační určení arabinózovým testem ve zkumavce. Použijeme biochemický test v plastové destičce, v našich podmínkách nejčastěji EN-COCCUStest. Povšimněte si, že i v něm je obsažen test štěpení arabinózy.

Odečtete u obou kmenů z předchozího úkolu biochemický mikrotest podle návodu.

Kmen:	H	G	F	E	D	C	B	A	Kód:
	1	2	4	1	2	4	1	2	Identifikace:
Kmen:	H	G	F	E	D	C	B	A	Kód:
	1	2	4	1	2	4	1	2	Identifikace:

### 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 6a: Testy citlivosti enterokoků a grampozitivních 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 nebyvají testovány. Do tabulky dopište názvy antibiotik dle příložené kartičky a pro všechny testované kmeny změřte zóny citlivosti. Na kartičce máte napsány hraniční zóny – podle nich interpretujte zóny vámi zjištěné jako citlivé (C), rezistentní (R) a dubiózní (D).

Kmen →					Poznámky:
Antibiotikum	∅ zóny(mm)	Interpr.	∅ zóny(mm)	Interpr.	
Ampicilin (AMP) (ref. zóna 10 mm)					*výsledek testu platí i pro doxycyklin
Nitrofurantoin (F) (ref. zóna 15 mm)					**quinupristin + dalfopristin, kombinace dvou streptograminových antibiotik
Vankomycin (VA) (ref. zóna 12 mm)					***k léčbě enterokokových infekcí se hodí pouze v kombinaci s betalaktamy
Tetracyklin* (TE) (ref. zóna 19 mm)					
Q. + D.** (QD) (ref. zóna 22 mm)					
Gentamicin (CN)*** (ref. zóna 8 mm)					

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

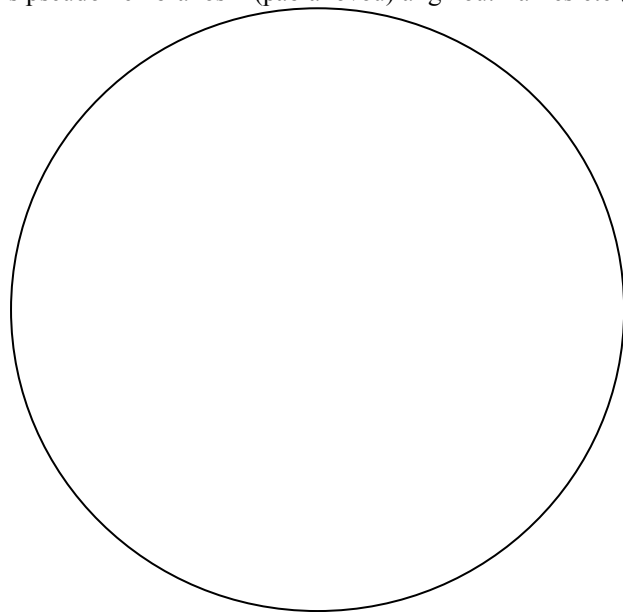
Na bočním stole můžete vidět test na *E. faecium*. Napište název antibiotika, které je lékem volby u infekcí způsobených *E. faecalis*, avšak z důvodu primární rezistence jej nelze použít u *E. faecium*: \_\_\_\_\_

### Úkol 6c: Demonstrace kmene VRE

Na bočním stole nebo v prezentaci máte také kmen VRE. S použitím své paměti a/nebo asistentky 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 antisérem. Jak toxin, tak i antitoxin difundují agarem. Prohlédněte si obrázek výsledku Elekova testu k průkazu toxicity kmene *Corynebacterium diphtheriae* vypěstovaného z krku pacienta s pseudomembranózní (pablánovou) angínou. Zakreslete (včetně popisu).



### 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 ukázkou 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 $\beta$ -galaktosidázy – ONPG-test

Filtrační papírek na diagnostickém proužku napuštěný vhodným reagens (o-nitrofenyl- $\beta$ -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  $\beta$ -galaktosidázu.

Kmen →			← Kmen
Výsledek →	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	← Výsledek

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

Tvorbu sirovodíku prokazujeme spolu se zkvašováním cukrů a produkcí CO<sub>2</sub> v kombinované půdě podle Hajny. Substrátem pro tvorbu H<sub>2</sub>S je thiosulfát sodný a indikátorem citrát železitoamonný. Sirovodík vytvořený redukcí thiosulfátu reaguje s ionty železa za vzniku sulfidu železitého. Produkce H<sub>2</sub>S 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 Kováčsova reagens – v pozitivním případě se na rozhraní půdy a činidla vytvoří červený prsteneček. Pokud bakterie štěpí ureu, půda se alkalizuje a barví se do růžova.

K úkolu 8c:

K úkolu 8d:

