

**P02**

**Biochemické identifikační  
metody**

**Diagnostika streptokoků**

# Osnova

- biochemické identifikační metody substrátové
  - metody rychlé, metody s kultivací
- nesubstrátové identifikační metody
- rod *Streptococcus*
- dg. rodu *Streptococcus*
- úkoly

# Přehled identifikačních metod

- **přímé metody** (mikrob, jeho část, produkty)
  - mikroskopie (průkaz ve vzorku i identifikace)
  - kultivace (průkaz + identifikace)
  - **biochemická identifikace (jen identifikace)**
  - průkaz antigenu (průkaz + identifikace)
  - průkaz NK (průkaz ve vzorku)
  - pokus na zvířeti (průkaz ve vzorku)
- **nepřímé metody** (průkaz protilátek)

# Biochemická identifikace

- rozdíly v metabolismu mezi bakteriemi
- bakterie mění **substrát** (cukry, AMK, apod.) **v produkt(y)**
- ideálně se produkt a substrát liší skupenstvím nebo barvou
- pokud se neliší, užitíme vhodný **indikátor**
- sledujeme **více než jeden znak** (atypické kmeny, možnost rozlišit více rodů a druhů)
- **% pravděpodobnosti**
- **index typičnosti** (shoda s „ideálním“ kmenem:  
 $T_{in} = 1,00$ )

# % pravděpodobnosti, $T_{in}$

- **99 %**,  $T_{in} = 0,95$   
(ideální stav)
- **99 %**,  $T_{in} = 0,63$   
atypický kmen nebo chyba diagnostiky
- **49,5 %**,  $T_{in} = 1,00$   
test je typický pro dva taxony, musíme dále rozlišit pomocí jiného testu

# Rychlé biochemické testy

- **katalázový test**

- **kataláza** – antioxidační enzym, chrání před oxidačním stresem
- do substrátu ( $H_2O_2$ ) rozmícháme bakterie
- **POZ = viditelné bublinky**



# Testy s diagnostickými proužky

- **Oxidáza** – cytochromoxidázový test
  - využívání **cytochrom c oxidázy** pro produkci energie
  - **OXI+** (bakterie využívá cytochrom c oxidázu, a tedy  $O_2$  jako terminální akceptor elektronů pro produkci energie); *P. aeruginosa*, *V. cholerae*
  - OXI- (bakterie využívá pro produkci energie jiné cytochromy, nebo  $O_2$  pro produkci energie nevyužívá vůbec); většina rodů čeledi *Enterobacteriaceae*



# Testy s diagnostickými proužky (2)

- **PYR test**
  - enzym PYRáza (pyrrolidonyl arylamidáza)
  - **odlišení *S. pyogenes*** od ostatních  $\beta$ -hemolytických streptokoků
- **INAC test** (Indoxyl-acetátový test)
  - **odlišení *M. catarrhalis*** od *N. meningitidis* a *N. gonorrhoeae*
- stripy pro detekci běžných  $\beta$ -laktamáz

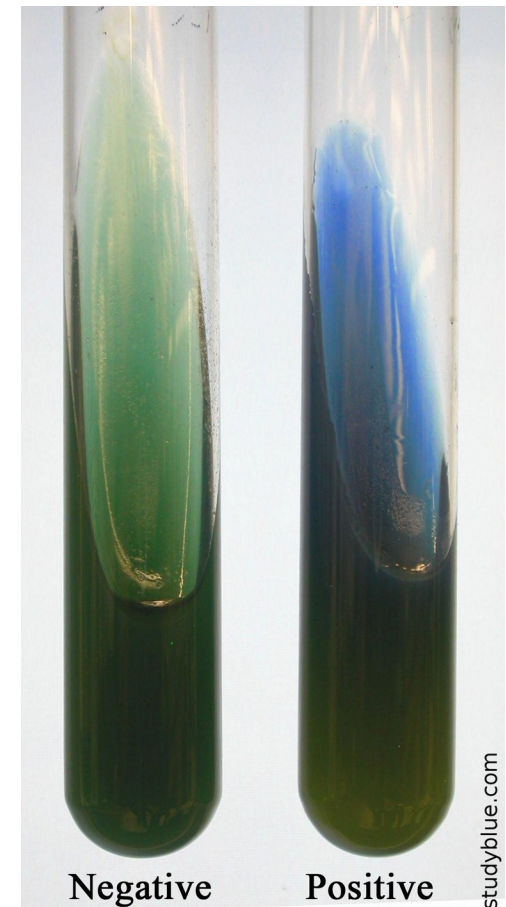


# Jednoduché zkumavkové testy

- **substrát je rozpuštěn v tekutině**, přimícháme testovaný kmen → změna zbarvení v celém objemu, nebo jako prstenec u hladiny
  - **arabinózový test** pro rozlišení *E. faecalis* a *E. faecium*  
POZ = žlutá (*E. faecium*)  
NEG = zelená (*E. faecalis*)
- **kmen je rozmíchán v tekutině**, přidáme proužek napuštěný substrátem
  - **VPT test** pro detekci tvorby acetoinu (POZ = červená)
  - **ONPG test** pro detekci  $\beta$ -galaktosidázy; rozlišení rodů *Citrobacter* (POZ = žlutá) a *Salmonella* (NEG = bezbarvá)

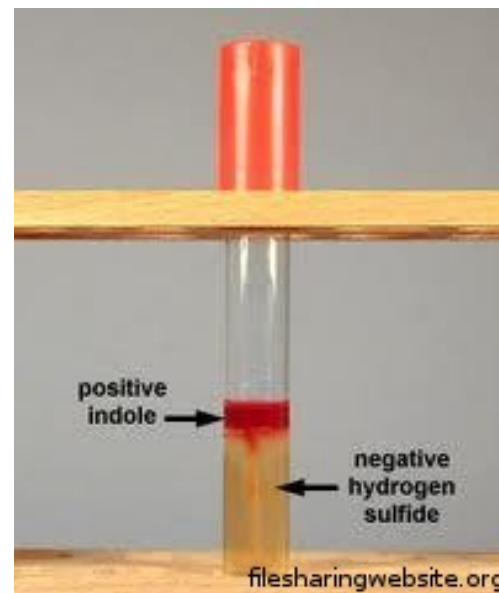
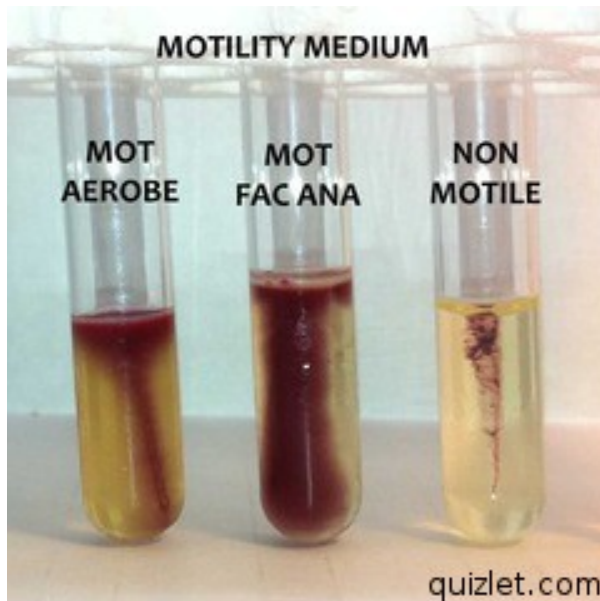
# Jednoduché zkumavkové testy (2)

- **agar obsahující substrát**
  - **Citrát dle Simmonse** pro detekci růstu bakterií na citrátu jako jediném zdroji uhlíku; rozlišení *Enterobacter aerogenes* (POZ = modrá) a *E. coli* (NEG = tmavě zelená)



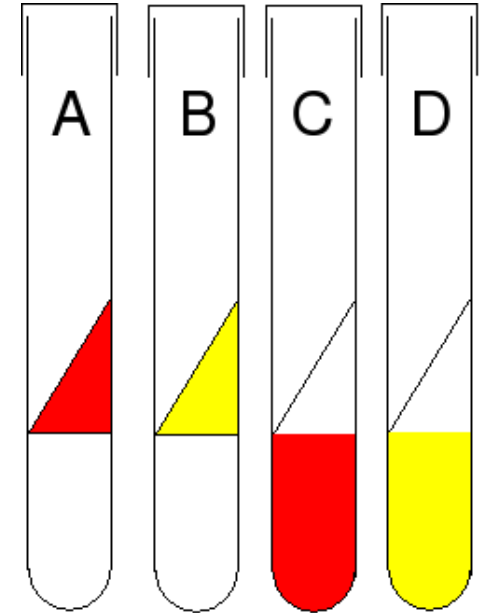
# Složité zkumavkové testy

- **test (půda) MIU** (Motility, Indol, Urea)
  - **pohyb** – pohyblivé bakterie rostou do okolí vpichu, nepohyblivé podél vpichu (shigelly)
  - **tvorba indolu** – po přidání Kovácsova činidla se vytvoří červený prstenec
  - **štěpení urey** – půda se zbarví fialově



# Složité zkumavkové testy (2)

- **Hajnova půda** (Kligler's Iron Agar, KIA)
  - štěpení laktózy (A = NEG, B = POZ)
  - štěpení glukózy (C = NEG, D = POZ)
  - produkce  $H_2S$  (POZ = zčernání půdy)
  - tvorba plynu (POZ = potrhaná půda, bublinky, půda vysunutá nahoru)
  
- očkování vpichem a tzv. hádkem



fr.wikipedia.org



# Příklad vyhodnocení Hajna+MIU

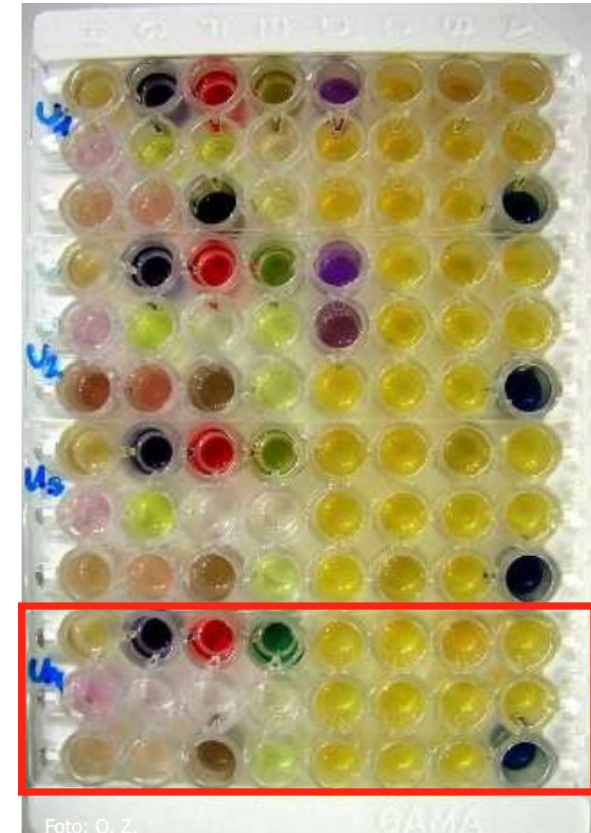
Test	Hajna			MIU		
	Glc	Lac	H <sub>2</sub> S	Mot	Ind	Ure
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	(+)
<i>E. coli</i>	+	+	-	+	+	-
<i>P. mirabilis</i>	+	-	+	+	-	+
S. Enterica	+	-	+	(+)	-	-
<i>C. freundii</i>	+	(+)	(+)	+	-	-

# Testy v plastových panelech

- **miniaturizace** sady jednoduchých zkumavkových testů
- počty testů v sadách se liší
- **destičky s lyofilizovanými substráty**
- přidání suspenze bakterií ve fyz. roztoku nebo v dodaném suspenzním médiu
- zbytek bakteriální suspenze se využije jako zkumavkový test (VPT, ONPG)
- **u nás nejběžnější testy** od firmy **Erba Lachema** (např. STAPHYtest 16, STREPTOtest 16, ENTEROtest 16, NEFERMtest 24, apod.)

# Testy v plastových panelech (2)

- NEFERMtest 24 (Erba Lachema)
  - jeden test tvoří tři řádky po osmi jamkách
- API 20 E (bioMérieux)
  - princip stejný, provedení se mírně liší





# Vyhodnocení destičkových testů

- **oktalové kódy** podle poz. a neg. výsledků
- trojici výsledků se přiřadí číslice od nuly po sedmičku (dvojice výsledků pak číslice nula až tři)
- kód vyhledáme v kódové knize nebo v příslušném softwaru

OXOID  
MICROBACT™  
IDENTIFICATION KITS

MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E

GNB 24E																										
GNB 12A / 12E											GNB 12B															
Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
			6			7			6			0		0			6		6		0					

Result / Resultado / Ergebnis /  
Résultat / Risultato / Resultat /  
Resultat / Resultado /  
Αποτέλεσμα

Sum / Suma / Summe / Somme /  
Somma / Sum / Summa /  
Soma / Άθροισμα

Identification / Identificación /  
Identifikation / Identifikation /  
Identificazione / Identifikation /  
Identificando / Identificação /  
Ταυτοποίηση

*E. coli*

resource.unisa.edu.au



# Další identifikační testy

- zkoumání další enzymové výbavy či faktorů virulence
  - **schopnost koagulovat králičí plazmu**
  - **hyaluronidázový test**
  - **testování pohyblivosti**
  - **diagnostické použití ATB** (optochin, bacitracin)
- nové identifikační metody
  - **MALDI-TOF** (ionizace laserem za přítomnosti matrice, spojení s detektorem doby letu)

# MALDI-TOF

- **rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností** v elektrickém/magnetickém poli
- díky matici  **lze analyzovat i velké biomolekuly** (při přímé ionizaci vzorku laserem dochází ke štěpení molekul nežádoucím způsobem)
- směs vzorku a matrice je ionizována laserem → ionty analyzované látky jsou urychleny silným elektrickým polem → vstupují do trubice detektoru → měření doby letu částice → výpočet poměru molekulové hmotnosti a náboje částice
- **hmotnostní spektrum se poté porovnává se známými profily** uloženými v knihovně

# Rod *Streptococcus*

- **G+ koky, KAT-, OXI-**
- dvojice, řetízky
- nepohyblivé
- kultivace na KA
- rozdělení dle hemolýzy ( $\alpha$  – viridující,  $\beta$  – hemolitické,  $\gamma$  – nehemolytické)
- dělení dle Lancefieldové: antigenní skupiny, nejčastěji A, B, C, E, F, G, H, ...  
(skup. D – dnes enterokoky, *S. bovis*)



# Přehled streptokoků

Změny na KA	
$\alpha$ -hemolýza (viridace)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	skupina „ústních streptokoků“
$\beta$ -hemolýza	<i>Streptococcus pyogenes</i> (sk. A dle Lancefieldové)
	<i>Streptococcus agalactiae</i> (sk. B dle Lancefieldové)
	skupina „non-A-non-B“ streptokoků
$\gamma$ -hemolýza (žádná)	streptokoky bez hemolýzy

# *Streptococcus pyogenes*

- *streptos* = ohebný, zkroucený jako řetěz; *puon* = hnis; *gennao* = tvořit
- group A streptococcus (GAS)
- úplná  $\beta$ -hemolýza, drobné kolonie
- PYR test, bacitracinový test
- původce **akutní tonsilitidy** (angíny), **hnisavých zánětů měkkých tkání (nekrotizující fasciitis)**, **spály, erysipelu** (tzv. růže) a **flegmón** (neohraničených bakteriálních zánětů), pneumonií, meningitid, sepsí;
- pozdní následky (**revmatická horečka, akutní glomerulonefritida**) - **ASLO**



# Akutní tonsilitida (angína)

- **nejčastější bakteriální původce *S. pyogenes***
- další původci: *S. pneumoniae*, staphylokoky, hemofily, influenza virus, herpes viry, coxsackie viry, EBV, ...
- horečka, oboustranná bolest v krku, zduřené uzliny





# Spála (scarlatina)

- angína s exantémem a projevy na sliznici (petechie)
- streptokok produkuje **pyrogenní** (erytrogenní) **toxin**



# Erysipel (růže)

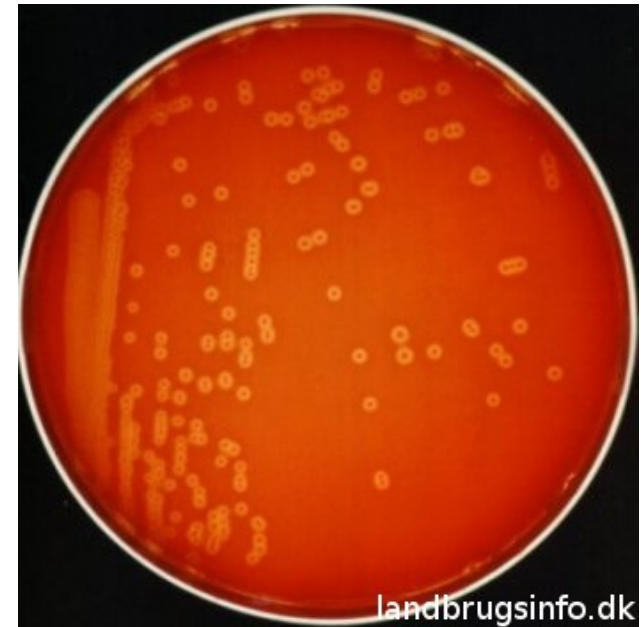
- ostře ohraničený zánět, nejčastěji v oblasti bérců a obličeji
- infekce kůže se šíří do kožních lymfatických cév, při opakovaném poškození chronické lymfatické otoky





# *Streptococcus agalactiae*

- *agalactia* = porucha tvorby mléka (záněty mléčné žlázy především u krav)
- group B streptococcus (GBS)
- neúplná  $\beta$ -hemolýza, větší kolonie
- pozitivní CAMP test
- **původce močových infekcí** (u žen v urogenitálním traktu a GIT)
- **infekce novorozenců** (**seps**e, pneumonie, meningitidy)
- infekce gravidních žen



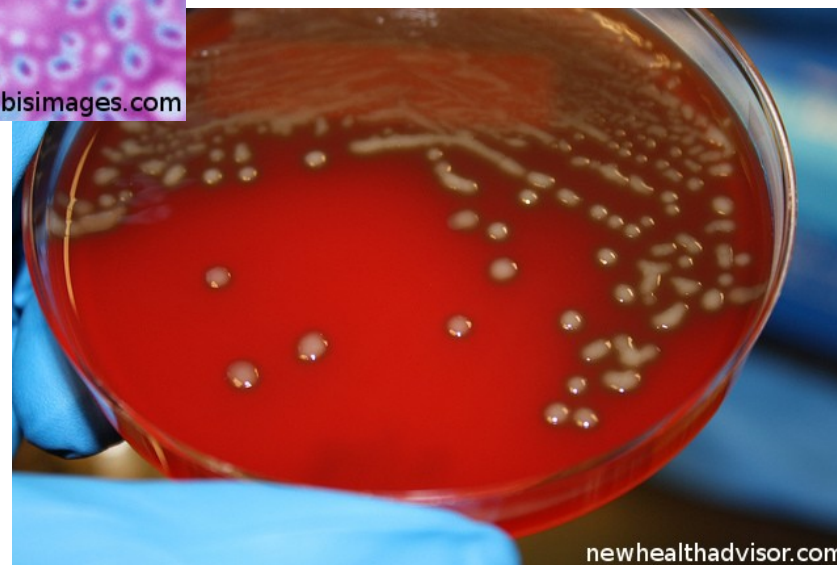
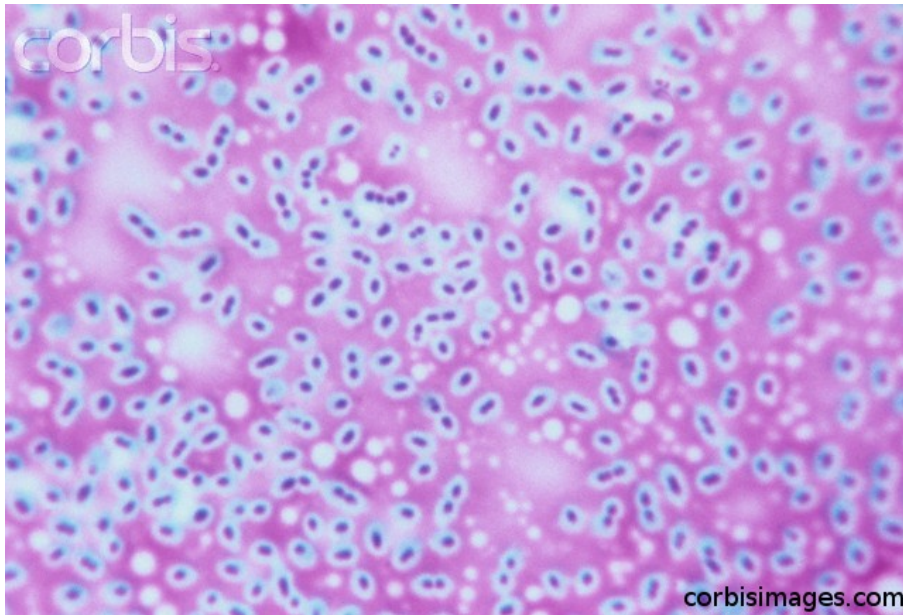
# „non-A-non-B“ streptokoky

- $\beta$ -hemolýza, ale nepatří ani do GAS (*S. pyogenes*) ani do GBS (*S. agalactiae*)
- **faryngitidy** (záněty hltanu), často přítomny bez klinických projevů
- *S. dysgalactiae*, *S. equi*
- **obvyčně se neurčují**, v případě potřeby se blíže identifikují průkazem antigenu

# *Streptococcus pneumoniae*

- „pneumokok“, dříve *Diplococcus pneumoniae*
- **dvoří dvojice** (nikoli řetízky), **lancetovitý** (kopíčkovitý) tvar buněk
- **α-hemolýza**
- opouzdřené buňky mají hlenovité kolonie (kapky oleje)
- v R-fázi netvoří pouzdro
- v malém množství i u zdravých osob
- **sinusitidy, pneumonie, otitis media, meningitidy, sepse**, endokarditidy
- nepovinné očkování (Pneumo23, Prevenar13, Synflorix)

# *Streptococcus pneumoniae* (2)

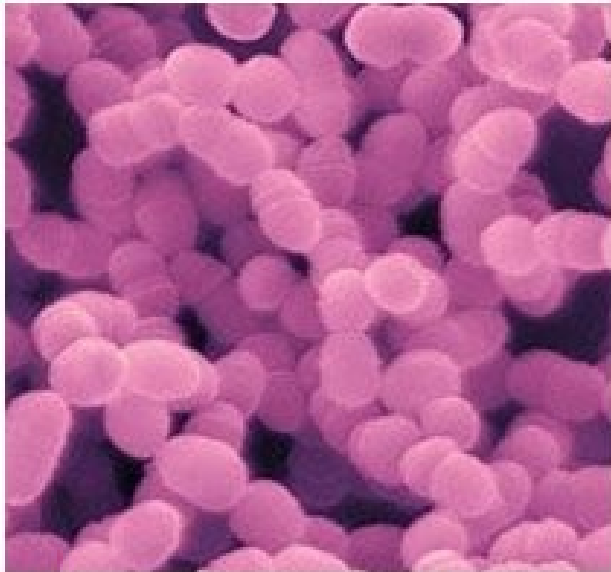


# „Ústní streptokoky“

- též alfa streptokoky nebo viridující streptokoky (obvykle  $\alpha$ -hemolytické streptokoky, kromě pneumokoka)
- normální součástí mikroflóry ústní dutiny a částečně i faryngu
- fyziologicky se neustále dostávají v malém množství do krve (ve velkém množství způsobují **subakutní bakteriální endokarditidy** - adherují na poškozené srdeční chlopně)
- útvar na chlopni = „vegetace“ - forma biofilmu (matrix tvoří krevní destičky a fibrin)
- *S. mutans* – **zubní kaz** (nejrychleji tvoří org. kyseliny)
- *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*

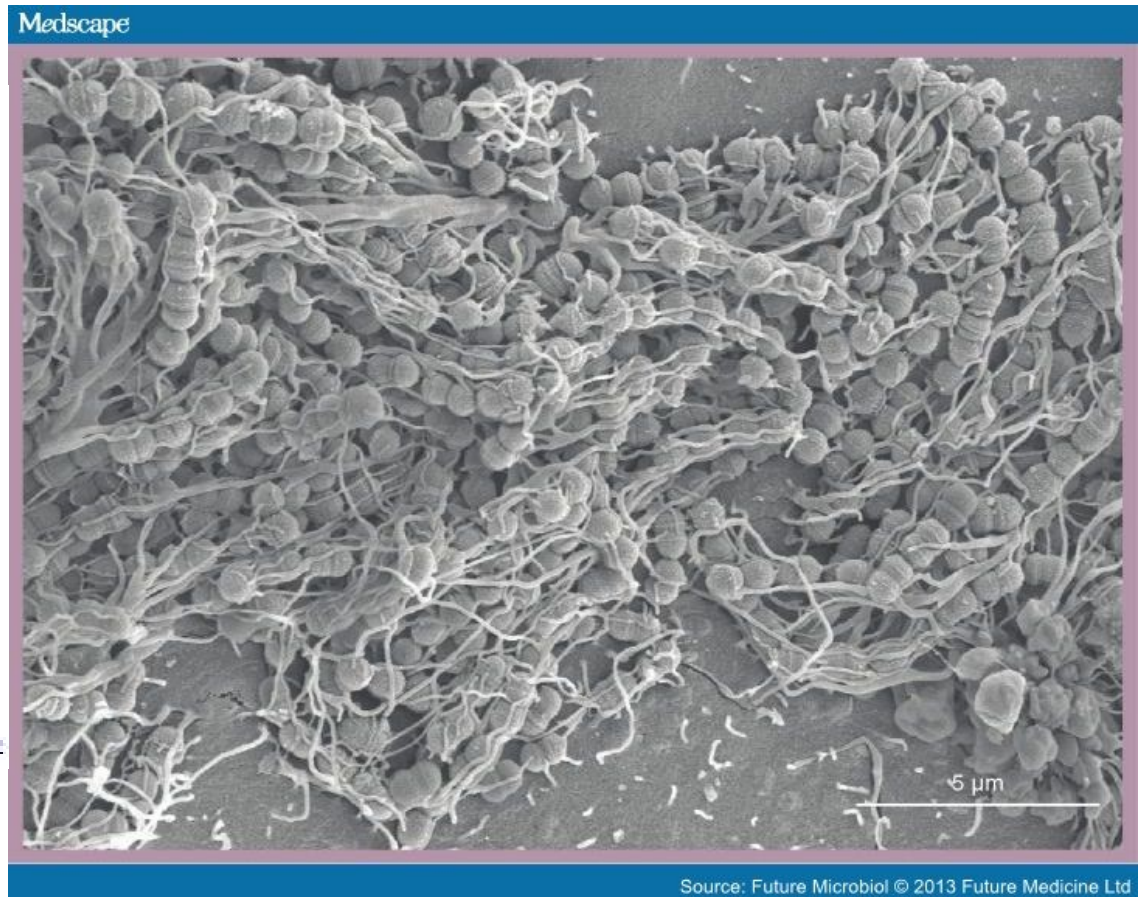


# „Ústní streptokoky“ (2)



**Streptococcus mutans**

Source: microbiologyfall2010.wikispaces.com



*Streptococcus salivarius* K12  
adherovaný k HEp-2 buňkám

# Léčba

- lék volby **penicilin**
- při prokázaných alergiích **makrolidy**
- léky další volby doxycyklin, kotrimoxazol, ampicilin, aj.
- rezervní ATB **vankomycin** (zatím žádné rezistence)
  
- testování in vitro citlivosti – difuzní diskový test na **MH agaru s krvinkami** (na obyčejném MH agaru prakticky nerostou)

# Diagnostika streptokoků

- **mikroskopie:** G+ koky
- **kultivace:** na KA kolonie šedé až bezbarvé, většinou drobné, *S. agalactiae* má větší kolonie
- **hemolýza:**  $\alpha$ -  $\beta$ - i  $\gamma$ -hemolýza
- **nerostou** na KA s 10 % NaCl (půda pro stafylokoky), ani na Slanetz-Bartley či žluč-eskulinové půdě (pro enterokoky)
- **KAT-, OXI-**
- **rezistentní na aminoglykosidy** (společně s enterokoky)



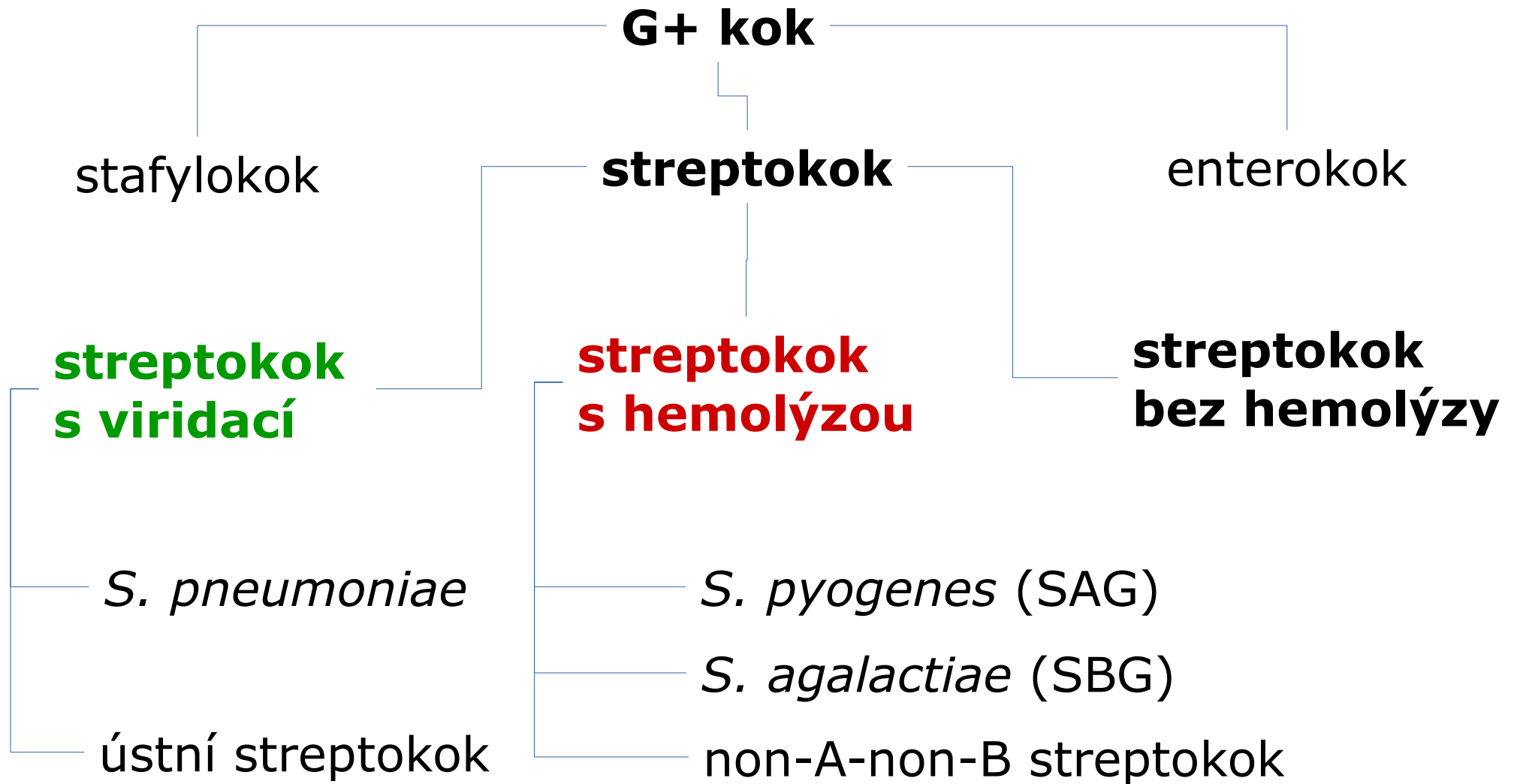
# Diagnostika streptokoků (2)

- **streptokoky s  $\alpha$ -hemolýzou (viridací)**  
Ize dále určovat **biochemickými testy**
- např. při nálezů v hemokultuře nebo likvoru dourčujeme původce
- vzorek z dutiny ústní či krku nikoliv, jsou tam běžnou flórou
- **streptokoky s  $\beta$ - a  $\gamma$ -hemolýzou** Ize dále určovat **latexovou aglutinací** (protože mají slabou biochem. aktivitu)
- určení non-A-non-B streptokoků dle Lancefieldové

# Diferenciální dg. streptokoků

- **hodnotíme hemolýzu** (viridace, hemolýza částečná či úplná, bez hemolýzy)
- **β-hemolýza:**
  - ***S. pyogenes*** (poz. **PYR test** a bacitracinový test)
  - ***S. agalactiae*** (poz. **CAMP test**)
- **α-hemolýza:**
  - ***S. pneumoniae*** poz. **optochinový test** na rozdíl od ostatních viridujících streptokoků

# Diferenciální dg. streptokoků (2)



# Úkol 1: Mikroskopie kmenů

- **obarvěte podle Grama všech osm kmenů**
- jeden z kmenů bude G- tyčinka (výsledek si poznamenejte a dále s ním nebudeme pracovat)

# Úkol 2: Kultivační a biochem. testy

- **Úkol 2a: Katalázový test k odlišení stafylokoků**
  - kolonie vmícháme do kapky  $H_2O_2$
  - **POZ = bublinky** (stafylokok → dále s kmenem nepracujeme)
  - NEG (streptokok nebo enterokok)
- **Úkol 2b: Růst na Slanetz-Bartleyově agaru**
  - **POZ = růst kmenu** (enterokok → dále s kmenem nepracujeme)
  - stejnému účelu sloužila i žluč-eskulinová půda

# Úkol 3: Kultivace na KA

- **pozorujte a zapište typ hemolýzy** (viridace, částečná hemolýza, úplná hemolýza, beze změny)
- **popište další vlastnosti kolonií** (snažte si povšimnout rozdílů mezi jednotlivými kmeny, tj. různých velikostí, pigmentace, typu hemolýzy apod.)

# Úkol 4: Streptokoky s viridací

- **Úkol 4a: Optochinový test**
  - odlišení *S. pneumoniae* od ostatních viridujících streptokoků
  - **pneumokok je citlivý k optochinu**, neměříme zónu inhibice (optochin se dnes již nepoužívá léčebně, zůstal jen v diagnostice)
- **Úkol 4b: Biochemické určení „ústního“ streptokoka**
  - streptokoky z likvoru a hemokultur
  - **STREPTOtest 16 (17 reakcí: 1. je VPT, 2. až 9. jsou v prvním řádku, 10. až 17. jsou ve druhém řádku)**

# Úkol 5: Streptokoky s hemolýzou

- **Úkol 5a: PYR test**

- diagnostický proužek
- kolonie se umístí na reakční plošku proužku, po 10 minutách se přikápně činidlo
- **POZ = červené zbarvení**

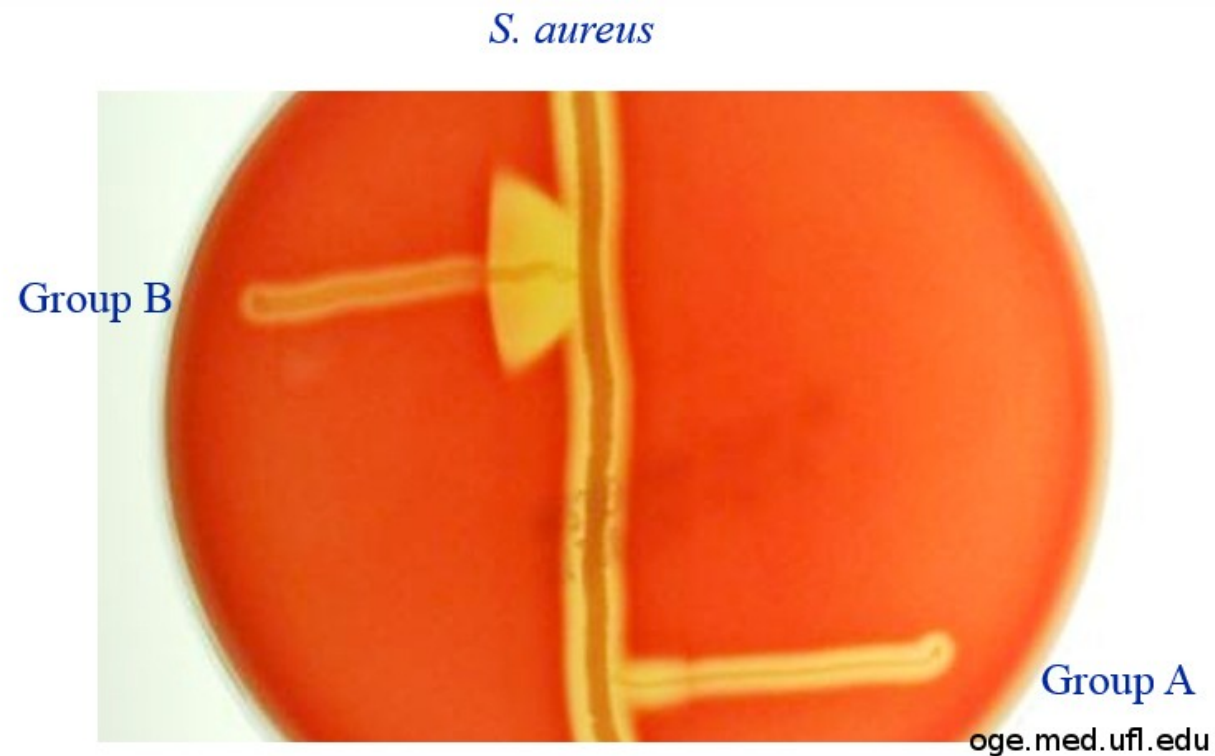
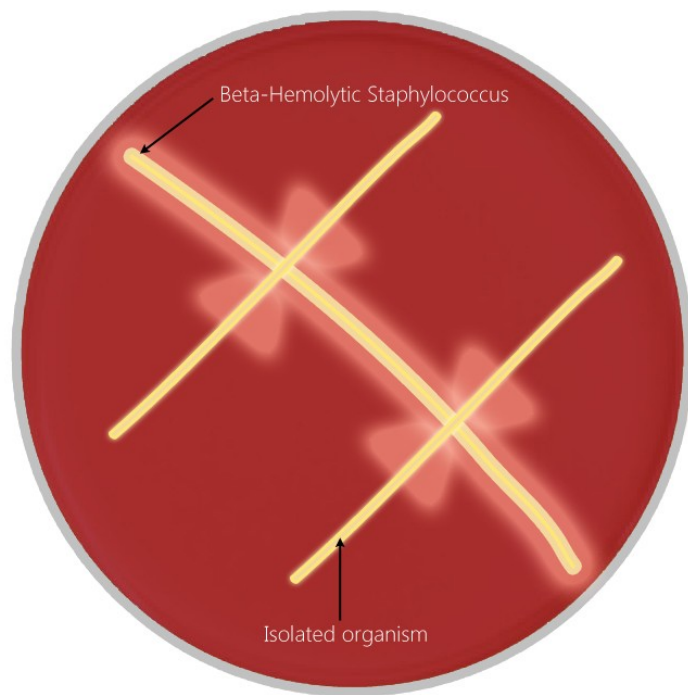
- **Úkol 5b: CAMP test**

- příklad synergického působení dvou hemolyzinů, a to **hemolyzinu *S. agalactiae* a  $\beta$ -hemolyzinu *S. aureus***
- **nelze použít k dg. *S. aureus*** (ne všechny zlaté stafylokoky produkují  $\beta$ -hemolyzin)



# Úkol 5b: CAMP test

- na agar se naočkuje laboratorní **kmen zlatého stafylokoka** tvořící  $\beta$ -hemolyzin, **kolmo k němu se očkují testované kmeny**



# Úkol 5c: aglutinační test

- lahvičky se směsí latex. částic s navázanými protilátkami
- z obrázku určete, se kterým testovaným sérem kmen aglutinuje



# Úkol 6: test citlivosti na ATB

- odečtete difusní diskový test – změřte zóny a porovnejte s referenčními hodnotami
- **horší patogeny většinou citlivější** než mírnější patogeny
- využíváme **MH agar s krvinkami** (na běžném MH by většina streptokoků nevyrostla)

# Úkol 7: Dg. pozdních následků streptokokových infekcí - ASLO

- po každé streptokokové infekci protilátky, vč. protilátek proti streptolyzinu O (streptokokový toxin)
- v případě, že množství těchto protilátek po infekci stoupá, zkříženě reagují s některými strukturami organismu → **pozdní následky streptokokových infekcí**
- **revmatická horečka, akutní glomerulonefritida**
- **ASLO**: zjištění míry **protilátkové odpovědi** po prodělané streptokokové infekci (**neprokazujeme tedy infekci** – ta už proběhla – ale zda nedochází k vývoji autoimunitní reakce)

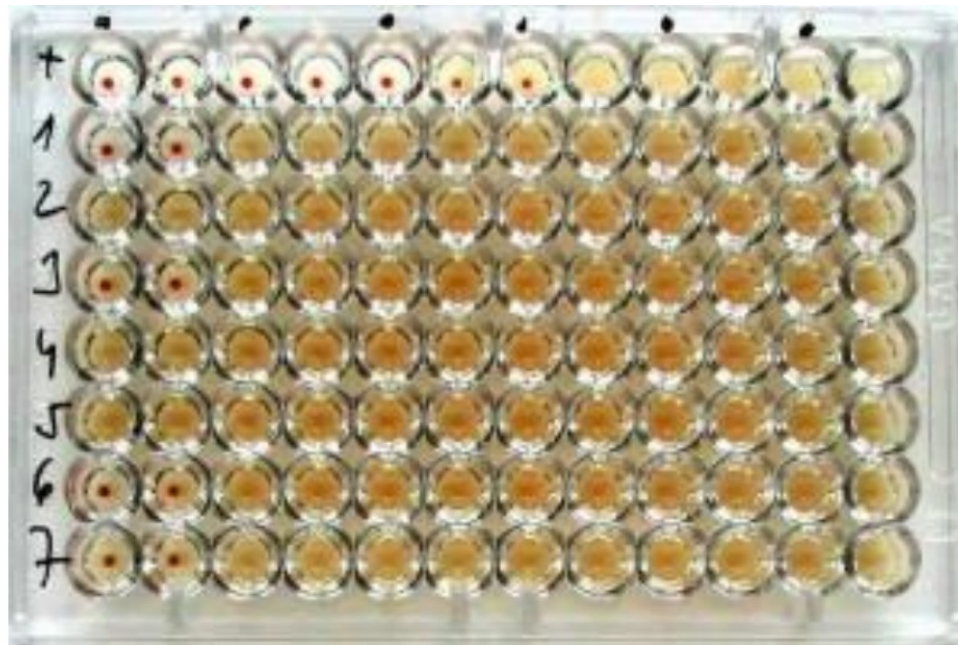
# Úkol 7: ASLO

- **neutralizace hemolýzy**
- streptolysin O za běžných okolností (nepřítomnost protilátek) hemolyzuje červené krvinky  
**NEG = hemolýza**
- v přítomnosti protilátky antistreptolysinu O dochází k zábraně hemolýzy a krvinky mohou sedimentovat  
**POZ = zábrana hemolýzy**
- **titr nad cca 200 m.j. riziko pozdních následků**

Jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hodnota m.j.	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911
Pozdní následky	nehrozí				hra- niční	hrozí						

# Úkol 7: ASLO (2)

- destička se odečítá naležato, první řádek je pozitivní kontrola
- další řádky jsou jednotliví pacienti
- hodnoty ředění jsou uvedeny v protokolu



# Úkol 8: Demontrace dalších testů

- Úkol 8a: Oxidázový test (**POZ = modrá** do 2 min)
- Úkol 8b: ONPG test (**POZ = žlutá** po 4 hod)
- Úkol 8c: Tvorba **H<sub>2</sub>S**, štěpení **sacharidů** a produkce **plynů** v Hajnově půdě.
- Úkol 8d: Průkaz **pohyblivosti**, tvorby **indolu** a štěpení **urey** (MIU)



# Úkol 8a: Oxidázový test

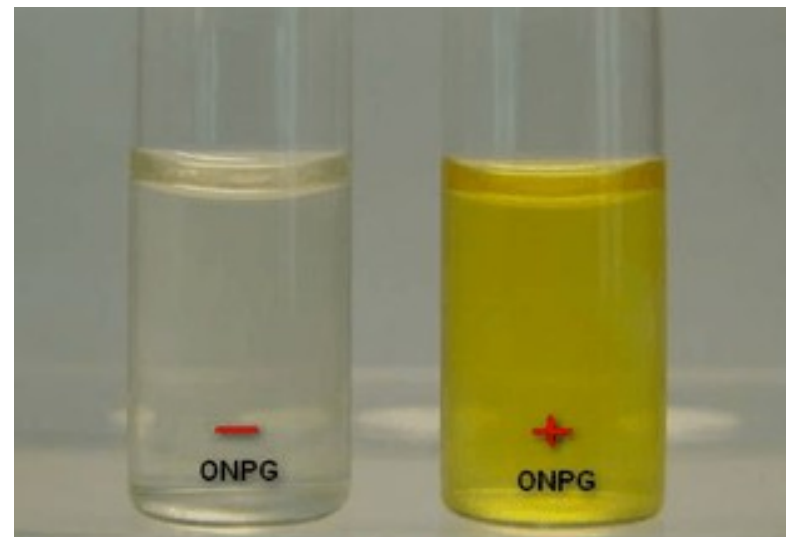
- **Oxidáza** – cytochromoxidázový test
  - Využívání **cytochrom c oxidázy** pro produkci energie
  - **OXI+** (bakterie využívá cytochrom c oxidázu, a tedy  $O_2$  jako terminální akceptor elektronů pro produkci energie); ***P. aeruginosa***, ***V. cholerae***
  - OXI- (bakterie využívá pro produkci energie jiné cytochromy, nebo  $O_2$  pro produkci energie nevyužívá vůbec); většina rodů čeledi ***Enterobacteriaceae***





# Úkol 8b: ONPG test

- **ONPG test** pro detekci  $\beta$ -galaktosidázy
- filtrační papírek na diagnostickém proužku je napuštěn vhodným reagens (o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid – analog laktózy), vkládá se do bakteriální suspenze
- **POZ = žlutá**
- **NEG = bezbarvá**



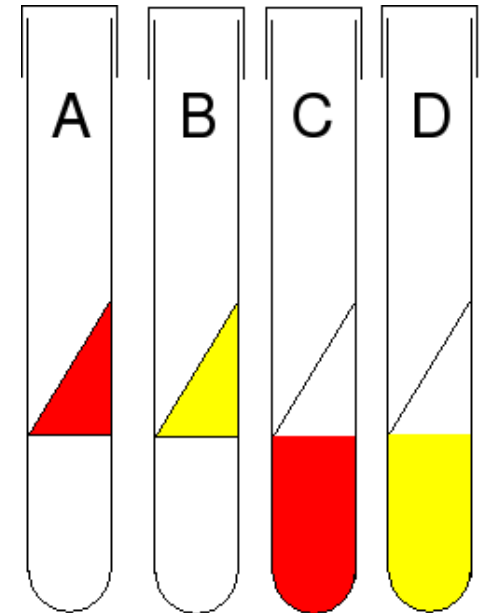
*Proteus vulgaris* (Left): ONPG Negative

*Escherichia coli* (Right): ONPG Positive

microbeonline.com

# Úkol 8c: Hajnova půda

- **Hajnova půda** (Kligler's Iron Agar, KIA)
  - štěpení laktózy (A = NEG, B = POZ)
  - štěpení glukózy (C = NEG, D = POZ)
  - produkce  $H_2S$  (POZ = zčernání půdy)
  - tvorba plynu (POZ = potrhaná půda, bublinky, půda vysunutá nahoru)
  - očkování vpichem a tzv. hádkem

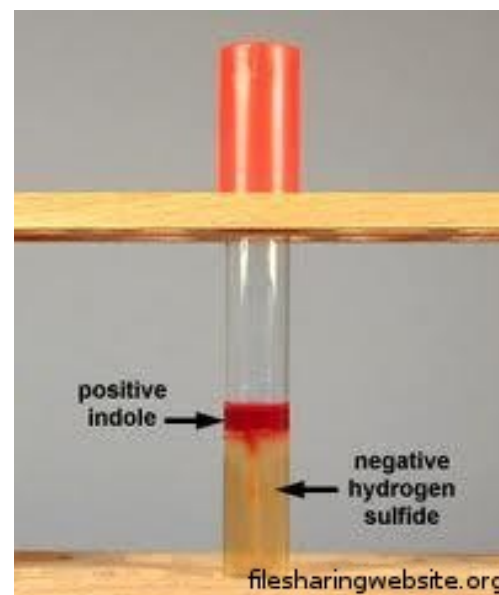
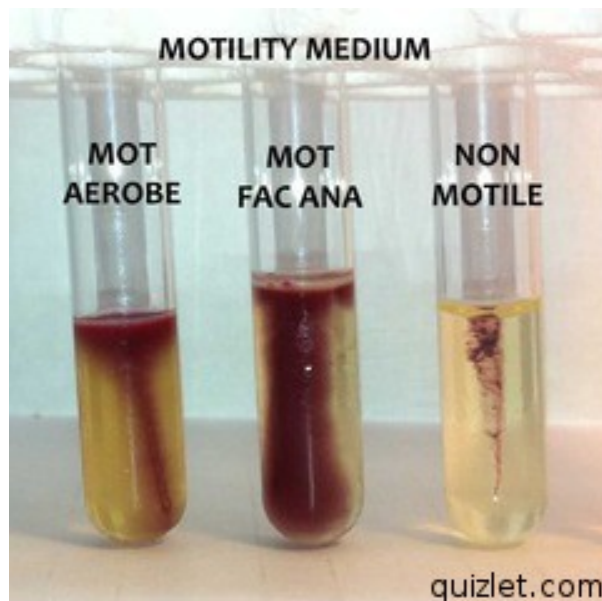


fr.wikipedia.org



# Úkol 8d: MIU

- **test (půda) MIU** (Motility, Indol, Urea)
  - **pohyb** – pohyblivé bakterie rostou do okolí vpichu, nepohyblivé podél vpichu (shigelly)
  - **tvorba indolu** – po přidání Kovácsova činidla se vytvoří červený prstenec
  - **štěpení urey** – půda se zbarví fialově



# Po tomto cvičení byste měli umět:

- vysvětlit význam biochemických identifikačních metod v mikrobiologii, popsat konkrétní příklady využití v diagnostice
- popsat zástupce rodu *Streptococcus*, vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- zhodnotit možnost tvorby biofilmu na srdečních chlopních a případných následků tohoto stavu
- vysvětlit význam testu ASLO a vysvětlit vztah k pozdním následkům streptokokových infekcí