

**Téma P02: 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								
<b>DÍLČÍ ZÁVĚR</b>									
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									
<b>KONEČNÝ ZÁVĚR</b>									

**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 grampozitivním 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 to 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.

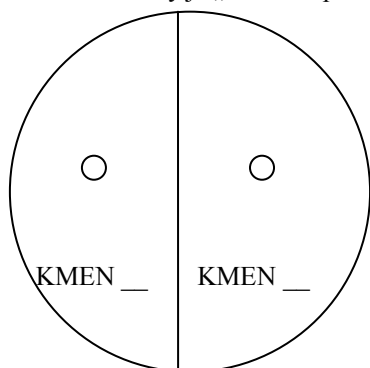
Nyní zapište do tabulky „dílní závěr“. Ke každému z kmenů K až S zapište „NENÍ STR“ (není streptokok) „HEMOL STR“ (částečná či úplná hemolýza) nebo „VIRID STR“ (streptokok s viridací)

### 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 barevně zakreslete a zapište do tabulky (zde 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 polyetylenového 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 biochemický proužkový test (na přítomnost pyrrolidonylarylamidázy), provedením je podobný například oxidázovému testu. Také zde se reakční ploškou dotýkáme testovaných kolonií, a výsledek se projeví jako barevná změna. Na rozíl od oxidázového testu ale 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. Tento test je pozitivní u *S. pyogenes* (a také u enterokoků). Negativní je výsledek *Streptococcus agalactiae* i všech non-A-non-B streptokoků.

*Poznámka: Někdejší bacitracínový test se dříve používal místo PYR-testu. Jeho princip je shodný s principem optochinového testu, jen s jiným antibiotikem. Pro nedostatečnou specifiitu byl již téměř opuštěn.*

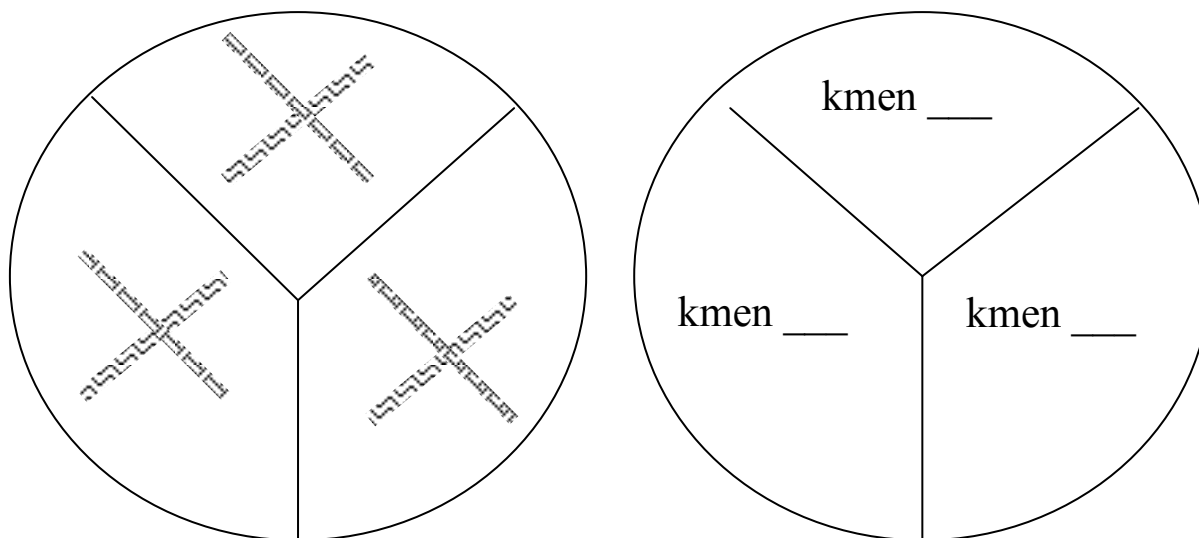
Vyplňte následující tabulku, včetně zakreslení výsledku PYR testu u všech tří testovaných kmenů.

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

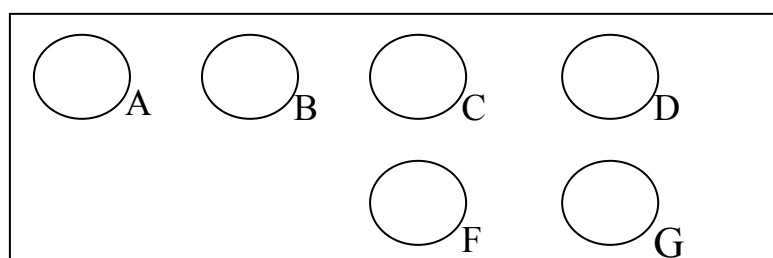
*Poznámka: CAMP test nemá nic společného s cyklickým adenosinmonofosfátem. Nazývá se podle jmen svých objevitelů. Proto se také píše CAMP test a nikoli cAMP test.*

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 (zapište písmeno kmene) →							
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 (zapište písmeno kmene) →					
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 mikroblem 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 nálezů 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														