**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-Bartleyúkol 2b |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Úkol 3Kulti- 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) Aglutinace |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **KONEČNÝ ZÁVĚR** |  |  |  |  |  |  |  |  |

## Úkol 1: Mikroskopie podezřelých kmenů

## Z časových důvodů dnes nebudete sami kmeny mikroskopovat, pouze si prohlédnete preparáty a/nebo obrázky preparátů, které studenti všeobecného lékařství v dopoledním praktiku zanechali v počítači.

## 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 výsečích 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 erytrocyty ve svém okolí, krevní agar nabude barvy séra, je průhledný

**částečná hemolýza** – bakterie svou činností rozloží erytrocyty 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 „dílčí 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: Bližší 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“. Výsledekbarevně zakreslete a zapište do tabulky (zde stačí ve formě + / –)

**Všimněte si:** samotné kolonie jsou velmi malé, takže spíše uvidíte agar. Agar *se* streptokoky je šedozelený v důsledku jejich viridace.

Nicméně s ohledem na určité rozdíly ve vzhledu kolonií není barva úplně stejná pro oba kmeny.

Agar *bez* streptokoků (uvnitř zóny pozitivního kmene) má svoji původní červenou barvu.

 KMEN \_\_

KMEN \_\_

**+** = jakákoli zóna citlivosti (není nutno měřit) **–** = není zóna

### b) Biochemické určení „ústního“ streptokoka

*Biochemické určení „ústního“ streptokoka připadá v úvahu jen výjimečně – většinou tehdy, když je kmen lokalizován mimo ústní dutinu, zejména v lokalitách normálně sterilních (např. v krevním řečisti nebo v ráně). V ostatních případech zcela vyhovuje označení „ústní streptokok“, nebo je nález dokonce součástí obecnějšího pojmu „běžná orofarangeální mikroflóra“ (nebo jen „běžná flóra“).*

Protože biochemickou identifikaci bakterií budeme probírat až v příštím praktiku, tento úkol vynecháme. Zájemci ovládající odečítání těchto testů najdou tento úkol na konci protokolu.

## 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.Výsledek testu pouze zapište do souhrnné tabulky na začátku protokolu.

## 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-hemolyzin 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:

kmen \_\_\_

kmen \_\_\_

kmen \_\_\_

## Úkol 6: Testy citlivosti na antibiotika u streptokoků

Z časových důvodů proveďte pouze u kmene, který byl určen jako *Streptococcuspneumoniae*. Povšimněte si toho, že u streptokoků nelze použít k testování čistý MH agar, protože na něm nerostou. Je tedy potřeba použít některou půdu s krvinkami, kde ale vzniká problém s interpretací – okraj růstu kolonií může být zaměněn za okraj hemolýzy nebo viridace.

|  |  |
| --- | --- |
| Kmen**(zapište písmeno kmene)**🡪 |  |
| Antibiotikum | Citlivý pokud je | Intermedi-ární pokud | Rezis-tentní | ∅ zóny (mm) | Interpre-tace |
| PenicilinP\* | ≥ 18 mm |  | < 18 mm |  |  |
| Tetracyklin\*TE | ≥ 23 mm | 20–22 mm | < 20 mm |  |  |
| VankomycinVA | ≥ 13 mm |  | < 13 mm |  |  |
| NitrofurantoinF | ≥ 15 mm |  | < 15 mm |  |  |

\*interpretuje se jako ampicilin

## Úkol 7: Úvod do „sérologie“

V lékařské mikrobiologii se více než v jiných oblastech používají testy založené na interakci mikrobiálního **antigenu** (povrchová součást mikroba, která stimuluje imunitní odpověď hostitele) a **protilátky** (bílkovinný produkt imunity hostitele, odezva na antigenní výzvu. Antigen a protilátka spolu tvoří **imunokomplex**, který můžeme různými způsoby detekovat (viz dále).

Tyto reakce lze rozdělit

**Podle použití:**

1. Určujeme mikrobiální antigen a k tomu používáme **laboratorní protilátku**
	1. Antigen **hledáme přímo ve vzorku** (například ve vzorku mozkomíšního moku – více v P06)
	2. Již jsme vykultivovali kmen a určujeme jeho antigen. Tento postup se nazývá **antigenní analýza** a používá se zpravidla k detailní diagnostice u mikrobů, které se neliší (nebo jen nepatrně) morfologickými, kultivačními, biochemickými aj. vlastnostmi, ale liší se právě typem antigenu
2. Provádíme**průkaz protilátek**(tj. tzv. **nepřímý průkaz**): vůbec v těle pacienta nehledáme mikroba, ale hledáme v něm protilátky, které si proti mikrobovi vytvořil. Tento postup používáme nejčastěji v případech, kdy přímý průkaz není možný, je obtížný, nebo je potřeba kombinovat přímou metodu (např. PCR) ještě s jednou další metodou.

V dnešním praktiku si budeme demonstrovat antigenní analýzu a průkaz protilátek, i když poněkud specifický.

**Podle typu použité reakce**

**Precipitace** – vizuálně detekujeme komplex vzniklý vazbou molekuly protilátky na molekulu antigenu

**Aglutinace** – od předchozí se liší tím, že místo molekuly antigenu máme k dispozici částici (korpuskuli) – buďto je to celý mikrob (antigen je na jeho povrchu), nebo je použit tzv. nosič, tedy cizí korpuskule, na kterou je antigen navázán. Může jít např. o latexovou částici (latexová aglutinace)

**Neutralizace**–používá se v případech, kdy antigen má zároveň toxické účinky, které protilátka přímo neutralizuje, nebo v případě, že jde o virový antigen a protilátka je schopna neutralizovat aktivitu celého viru

**Komplementfixace, reakce se značenými složkami**(např. ELISA), **imunochromatografické** a jiné testy – budou probrány později

V dnešním praktiku si ukážeme příklad aglutinace a příklad neutralizace.

## a) 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).**

D

C

B

A

G

F

## b) Diagnostika pozdních následků streptokokových infekcí – vyšetření ASLO

***Jak bylo napsáno výše, průkaz protilátek zpravidla provádíme 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 – nejde o přítomnost protilátek (ta je po prodělané infekci normální a tu předpokládáme), ale o jejich zvýšené množství protilátek. To v daném případě indikuje autoimunitní reakci (tj. protilátky se „zvrhly“ a chybně reagují se strukturami vlastního těla).***

***Princip:****Neutralizační reakce: Protilátky brání hemolyzinu (streptolyzin O – antigen) hemolyzovat králičí erytrocyty. Hladina ASLO se zvyšuje po nákazách vyvolaných hemolytickými streptokoky skupiny A (méně často i jiných). Riziko pozdních následků streptokokových nákaz 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 důlku;* ***pozitivita = zábrana hemolýzy, negativita = hemolýza****)* a interpretujte z hlediska rizika pozdních následků streptokokové infekce.

## ASLO

### Nepovinný úkol 4b: 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: 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 přikápne určité činidlo.

**Vyhodnocení testu.** Zhodnoťte biochemickou aktivitu kmene „ústního“ streptokoka a určete jej na úroveň druhu. Výsledky jednotlivých reakcí zapište do protokolu. Jako první odečtěte 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 mikrotest (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*Streptococcus* \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | % pravděpod. | T index |