

Téma P02: Diagnostika streptokokůK 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) 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 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

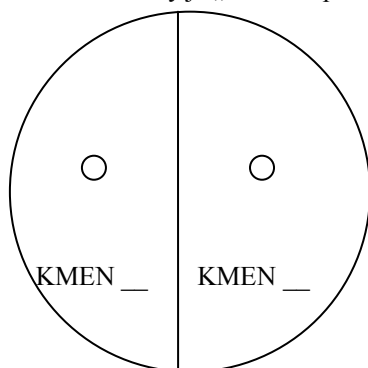
Na miskách s krevním agarem máte opět všechny kmeny. Ty, které jste vyloučili v úkolech 1 a 2, nemusíte popisovat, pro porovnání se však na ně podívejte. Zapište vlastnosti kmenů do tabulky.

Nyní zapište do tabulky „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: Blíže 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“. Výsledek **barevně** zakreslete a zapište do tabulky (zde stačí ve formě + / -)



Všimněte si: samotné kolonie jsou velmi malé, takže spíše uvidíte agar. Agar se streptokoky je šedo-zelený 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.

⊕ = 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 řečišti 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.

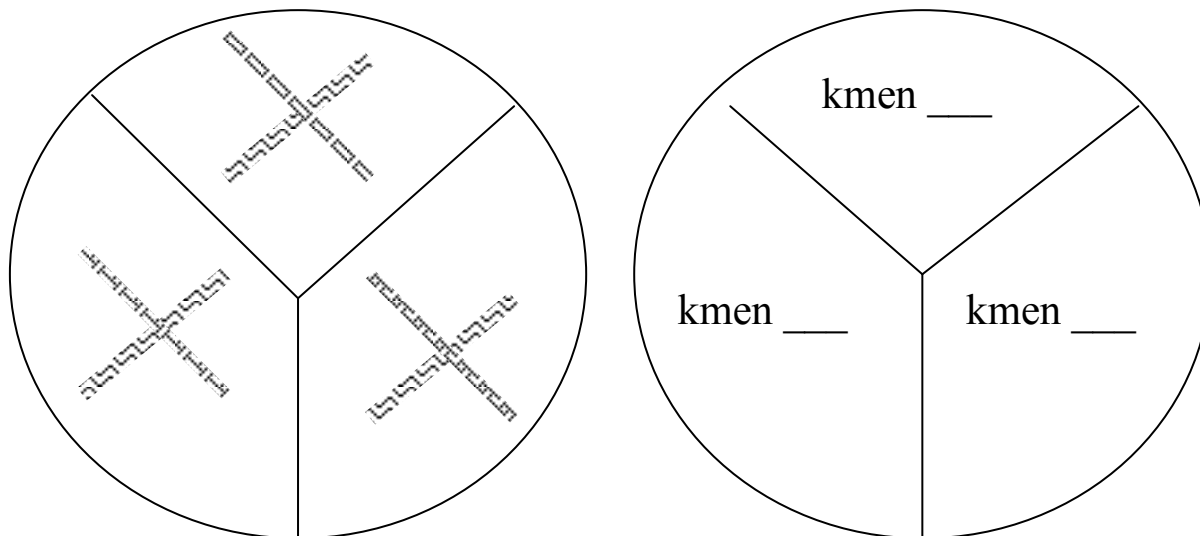
a) PYR test

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-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:



Úkol 6: Testy citlivosti na antibiotika u streptokoků

Z časových důvodů proveďte pouze u kmene, který byl určen jako *Streptococcus pneumoniae*. 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	Ø zóny (mm)	Interpre-tace
Penicilin P*	≥ 18 mm	16–17 mm	< 18 mm		
Tetracyklin* TE	≥ 23 mm	20–22 mm	< 20 mm		
Vankomycin VA	≥ 13 mm	10–12 mm	< 13 mm		
Nitrofurantoin F	≥ 15 mm	12–14 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:

- Určujeme mikrobiální antigen a k tomu používáme **laboratorní protilátku**
 - Antigen **hledáme přímo ve vzorku** (například ve vzorku mozkomíšního moku – více v P06)
 - Již jsme vykultivovali kmen a určujeme jeho antigen. Tento postup se nazývá **antigenní analýza** a používá se zpravidla k detailní diagnostice u mikrobu, které se neliší (nebo jen nepatrně) morfológickými, kultivačními, biochemickými aj. vlastnostmi, ale liší se právě typem antigenu
- 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 dnešní praxi 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 navázan. Může jít např. o latexovou částici (latexová aglutinace)

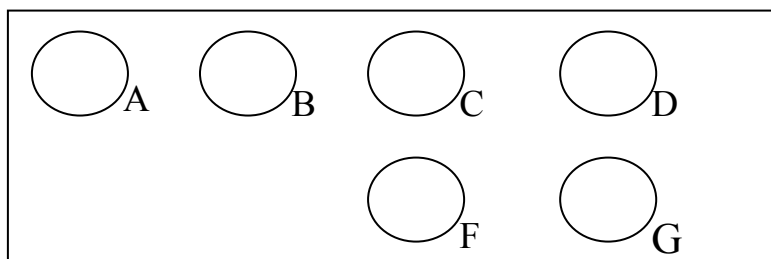
Neutralizace – používá se v případech, kdy antigen má zároveň toxické účinky, které protilátka přímo neutralizuje, nebo v případě, že jde o virový antigen a protilátka je schopna neutralizovat aktivitu celého viru

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, **azapište do tabulky definitivní závěr (určení jednotlivých streptokoků).**



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 (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 nález 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.

	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911	ASLO v m. j.	Interpretace
K+	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
P5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

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 kápně 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 přikápně 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 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						% pravděpod.						T index					
<i>Streptococcus</i> _____																	