

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

Úkol 0: Demonstrace některých testů biochemické identifikace v klinické mikrobiologii

Prohlédněte si a zakreslete příklady identifikačních testů, které se sice nepoužívají k diagnostice enterokoků, ale zato se s nimi setkáme v diagnostice jiných klinicky významných bakterií. Testy jsou pro ukázkou připraveny na bočním stole. Zakreslete si ukázky možných výsledků testů.

Testy, které se používají u enterokoků, najdete v dalších úkolech.

Úkol 0a: 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 0b: Důkaz produkce β -galaktosidázy – ONPG-test

Filtrační papírek na diagnostickém proužku napuštěný vhodným reagens (o-nitrofenyl- β -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 β -galaktosidázu.

Kmen →					← Kmen
Výsledek →					← Výsledek

Úkol 0c: Tvorba sirovodíku, štěpení sacharidů a produkce plynů v půdě Hajnově

Tvorbu sirovodíku prokazujeme spolu se zkvašováním cukrů a produkcí CO₂ v kombinované půdě podle Hajny. Substrátem pro tvorbu H₂S je thiosulfát sodný a indikátorem citrát železitoamonný. Sirovodík vytvořený redukcí thiosulfátu reaguje s ionty železa za vzniku sulfidu železitého. Produkce H₂S se projeví zčernáním spodní části půdy. *S. Typhi* dělá jen užoučký černý proužek na rozhraní šikmé části a plného sloupce.

Podle pokynů vyučujícího zhodnoťte štěpení sacharidů a produkci plynů u testovaných kmenů.

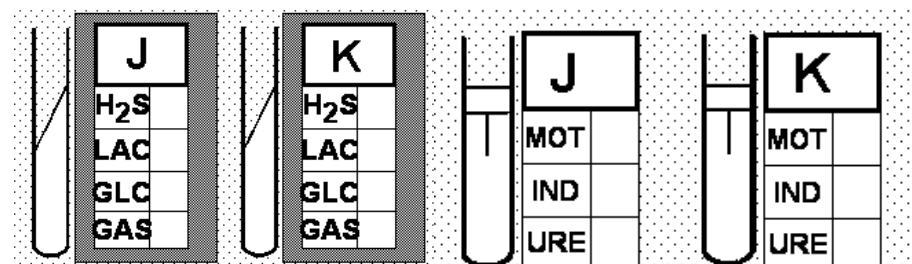
Výsledky zakreslete a zapište.

Úkol 0d: 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 Kovácsova 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 0c:

K úkolu 0d:



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 Kulti- vace (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									
MALDI-TOF Úkol 4b									
Růst v ledničce Úkol 5a									
DEFINITIVNÍ ZÁVĚR*									

*U G+ tyčinek napište pouze rodové jméno. Druhové určení by vyžadovalo přesnější testy, které nemohou být v praktiku provedeny.

Úkol 1: Mikroskopie podezřelých kmenů

Stejně jako v minulém praktiku prohlédněte preparáty a/nebo jejich obrázky v počítači. Zapište do tabulky.

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 naředlé 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 kmény, které jsou G+.

Poznámka: Testování katalázy u G+ tyčinek se může zdát zbytečné, protože *Listeria*, *Corynebacterium* i *Bacillus* jsou v testu pozitivní. Ovšem některé jiné koryneformní tyčinky (např. *Arcanobacterium*) jsou negativní, a proto má kataláza v diagnostice G+ tyčinek své místo.

b) Růst na Slanetz-Bartleyho půdě

Na misce máte naočkované tytéž kmény 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) MALDI-TOF pro přesnější diagnostiku enterokoků a koryneformních tyčinek

Ačkoli arabinózový test lze považovat za dostatečný pro běžné případy, v některých situacích potřebujeme diagnostiku založenou na více znacích a schopnost detekovat více než dva druhy enterokoků. Podobně termín "koryneformní tyčinky" obvykle představuje dostatečnou úroveň určení korynebakterií a příbuzných bakterií (zejména pokud jsou izolovány z kůže), ale ne pro důležité izoláty (například z krevního oběhu).

*Jak pro enterokoky, tak i pro koryneformní tyče je možné použít některé biochemické testy. Test na *Enterococcus* je vyráběn i v Česku ("EN-COCUSTest" firmy Erba Lachema), ale neexistuje žádný test Lachema pro koryneformní tyčinky, takže by bylo zapotřebí použít jiné testy (například API® Coryne od firmy Bio-Mérieux). V poslední době je také možné oba nahradit metodou MALDI-TOF.*

Odečtěte výsledky MALDI-TOF u tří z vašich kmenů (dva enterokoky a jedna koryneformní tyčinka).

Napište výsledky do tabulky a odpovězte na následující otázku:

Do jaké úrovně jsou kmeny určeny pomocí MALDI-TOF? Podtrhněte, co platí:

První enterokok, tzn. kmen ____ (napište písmeno) je určen na *úroveň rodu – úroveň druhu*

Druhý enterokok, tzn. kmen ____ (napište písmeno) je určen na *úroveň rodu – úroveň druhu*

Koryneformní tyčinka, tzn. kmen ____ (napište písmeno) je určena na *úroveň rodu – úroveň druhu*

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 nebývají testovány.

Interpretujte kmeny jako citlivé (C), intermediární (I) či rezistentní (R) k daným antibiotikům.

Antibiotikum	Kmen →			Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace
	Citlivý pokud je	Intermediární pokud	Rezistentní				
Ampicilin AMP	≥ 10 mm	8–9 mm	< 8 mm				
Nitrofurantoin F	≥ 15 mm	X	< 15 mm				
Vankomycin VA	≥ 12 mm	X	< 12 mm				
Tetracyklin* TE	≥ 19 mm	15–18 mm	< 15 mm				
Q. + D.** QD	≥ 22 mm	20–22 mm	< 20 mm				
Gentamicin CN***	≥ 8 mm	X	< 8 mm				

*výsledek testu platí i pro doxycyklin

**quinupristin + dalfoipristin, kombinace dvou streptograminových antibiotik

***k léčbě enterokokových infekcí se hodí pouze v kombinaci s betalaktamy

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 pseudomembranósní (pablánovou) angínou. Zakreslete (včetně popisu).

