**Téma P03: Dg. některých dalších grampozitivních baktérií (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 ukázku připraveny na bočním stole. Zakreslete si ukázky možných výsledků testů.

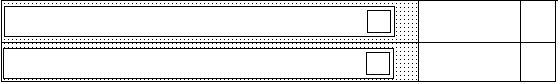
Testy, které se používají u enterokoků, najdete v dalších úkolech.

## 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.



Kmen:

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🡪 | ONPG | 🡨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 uzoučký černý proužek na rozhraní šikmé části a plného sloupce.

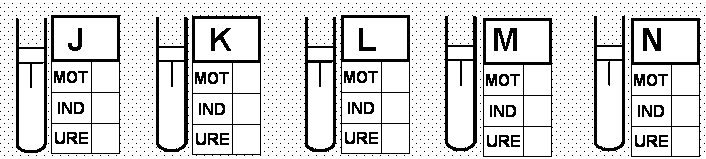
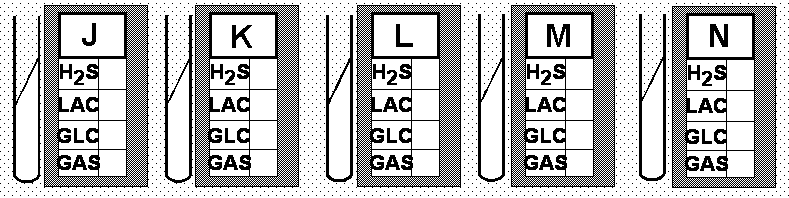
Podle pokynů vyučujícího zhodnoťte štěpení sacharidů a produkci plynů u testovaných kmenů.

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 očkovány 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 prstenec. 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, plsťovité 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 našedlé kolonie, velmi podobné enterokokovým, bez hemolýzy nebo s hemolýzou, mikroskopicky drobnější než *Bacillus*, neuspořádané v palisádách, ale spíše v krátkých řetízcích.

***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 kmeny, 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+ tyčineksvé místo.

## b) Růst na Slanetz-Bartleyho půdě

Na misce máte naočkované tytéž kmeny 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

Prověřte 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-COCCUStest 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.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Kmen 🡪 | | | |  | |  | |
| Antibiotikum | Citlivý pokud je | Intermedi-ární pokud | Rezis-tentní | ∅ zóny (mm) | Interpre-  tace | ∅ zóny (mm) | Interpre-  tace |
| Ampicilin  AMP | ≥ 10 mm | 8–9 mm | < 8 mm |  |  |  |  |
| Nitrofurantoin  F | ≥ 15 mm |  | < 15 mm |  |  |  |  |
| Vankomycin VA | ≥ 12 mm |  | < 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 |  | < 8 mm |  |  |  |  |

*\*výsledek testu platí i pro doxycyklin*

*\*\*quinupristin + dalfopristin, 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: Demonstracekmene 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 pseudomembranosní (pablánovou) angínou. Zakreslete (včetně popisu).