

P03

Základy biochemické identifikace bakterií

Diagnostika některých dalších grampozitivních bakterií

Osnova

- biochemické identifikační metody substrátové
 - metody rychlé, metody s kultivací
- nesubstrátové identifikační metody
- rod *Enterococcus*
- G+ tyčky
- diagnostika enterokoků a G+ tyček
- úkoly

Přehled identifikačních metod

- **přímé metody** (mikrob, jeho část, produkty)
 - mikroskopie (průkaz ve vzorku i identifikace)
 - kultivace (průkaz + identifikace)
 - **biochemická identifikace (jen identifikace)**
 - průkaz antigenu (průkaz + identifikace)
 - průkaz NK (průkaz ve vzorku)
 - pokus na zvířeti (průkaz ve vzorku)
- **nepřímé metody** (průkaz protilátek)

Biochemická identifikace

- **rozdíly v metabolismu** mezi bakteriemi
- bakterie mění **substrát** (cukry, AMK, apod.) **v produkt(y)**
- **přednostně se metabolizují cukry** před AMK
- ideálně se produkt a substrát liší skupenstvím nebo barvou
- pokud se neliší, užitíme vhodný **indikátor**
- sledujeme **více než jeden znak** (atypické kmeny, možnost rozlišit více rodů a druhů)
- **% pravděpodobnosti**
- **index typičnosti** (shoda s „ideálním“ kmenem:
 $T_{in} = 1,00$)

% pravděpodobnosti, T_{in}

- **99 %, $T_{in} = 0,95$**
ideální stav
- **99 %, $T_{in} = 0,63$**
atypický kmen nebo chyba diagnostiky
- **49,5 %, $T_{in} = 1,00$**
test je typický pro dva taxony, musíme dále rozlišit pomocí jiného testu

Endova půda

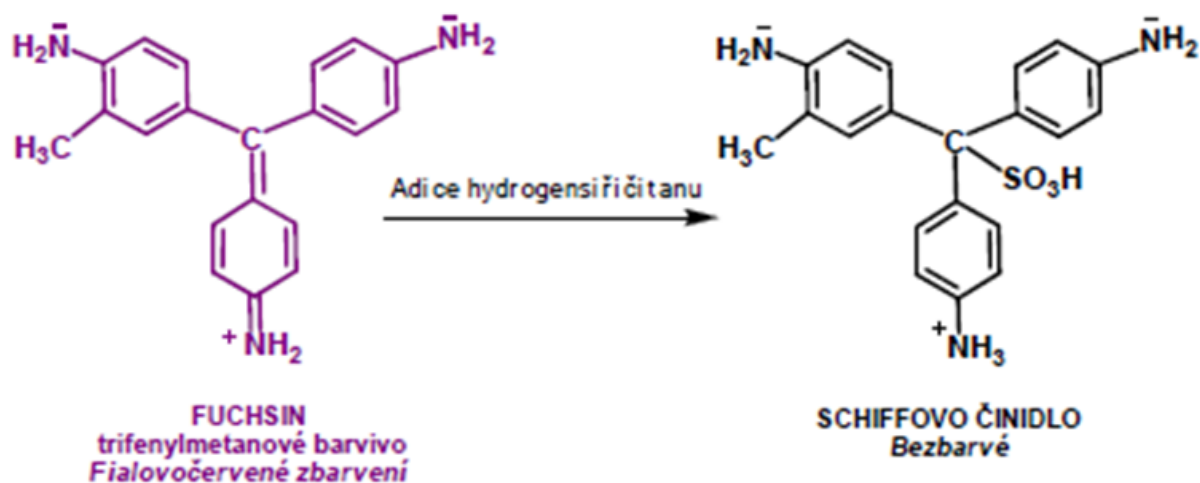
- na Endově půdě rostou **pouze některé G- bakterie** (*Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, GNFB)
- **laktóza pozitivní (červené, včetně okolí**, jinak může jít pouze o pigment!)
a **negativní (bledé)**
- *Escherichia coli* (růžové, červené zbarvení, až kovový vzhled)
- *Enterobacter/Klebsiella* (velké mukoidní červené kolonie)
- *Proteus, Salmonella, Shigella* (bezbarvé až jemně růžové)
- *Pseudomonas* (nepravidelné, bezbarvé)



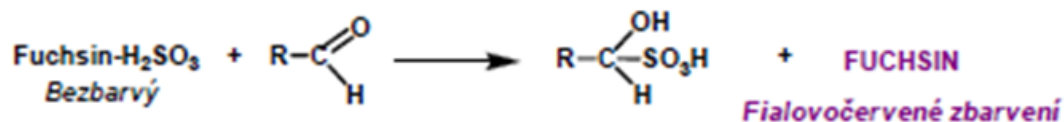
Endova půda (2)

- kultivace + **identifikace**
- **v průběhu metabolismu laktózy vznikají aldehydy**
- **Schiffovo činidlo** (fuchsin + Na₂SO₃)

Příprava činidla



Reakce s aldehydem



Rychlé biochemické testy

- **katalázový test**

- **kataláza** - antioxidační enzym, chrání před oxidačním stresem
- do substrátu (H_2O_2) rozmícháme bakterie
- **POZ = viditelné bublinky**



Testy s diagnostickými proužky

- **Oxidáza** – cytochromoxidázový test
 - využívání **cytochrom c oxidázy** pro produkci energie
 - **OXI+** (bakterie využívá cytochrom c oxidázu, a tedy O_2 jako terminální akceptor elektronů pro produkci energie); ***P. aeruginosa***, ***V. cholerae***
 - OXI- (bakterie využívá pro produkci energie jiné cytochromy, nebo O_2 pro produkci energie nevyužívá vůbec); většina rodů čeledi ***Enterobacteriaceae***



Testy s diagnostickými proužky (2)

- **PYR test**
 - enzym PYRáza (pyrrolidonyl arylamidáza)
 - **odlišení *S. pyogenes*** od ostatních β -hemolytických streptokoků
- **INAC test** (Indoxyl-acetátový test)
 - **odlišení *M. catarrhalis*** od *N. meningitidis* a *N. gonorrhoeae*
- stripy pro detekci běžných β -laktamáz

Jednoduché zkumavkové testy

- **přednostně se metabolizují cukry** před AMK:
 - **cukry** → org. kyseliny → **pH klesá**
 - **AMK** → deaminace → vznik amoniaku → **pH roste**
 - metabolizování komplexního média:
 - pH nejdříve klesá (dokud jsou k dispozici cukry) → pH opět roste (metabolizování AMK)
- **acidobazické indikátory:**
 - **detekce změn pH v průběhu růstu mikrobů**
 - **detekce utilizace konkrétních substrátů** (např. cukrů nebo AMK)

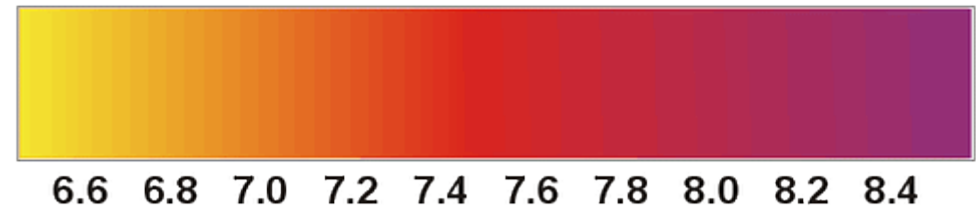
Jednoduché zkumavkové testy (2)

- **acidobazické indikátory:**

- **fenolová červeň**

- běžně používaná pro **buněčné kultury** a **biochemické testy**

alliedpoolsuppliesnservice.wordpress.com



- **bromthymolová modř**

- sledování fotosyntetické aktivity a **biochemické testy**

cheminst.ca

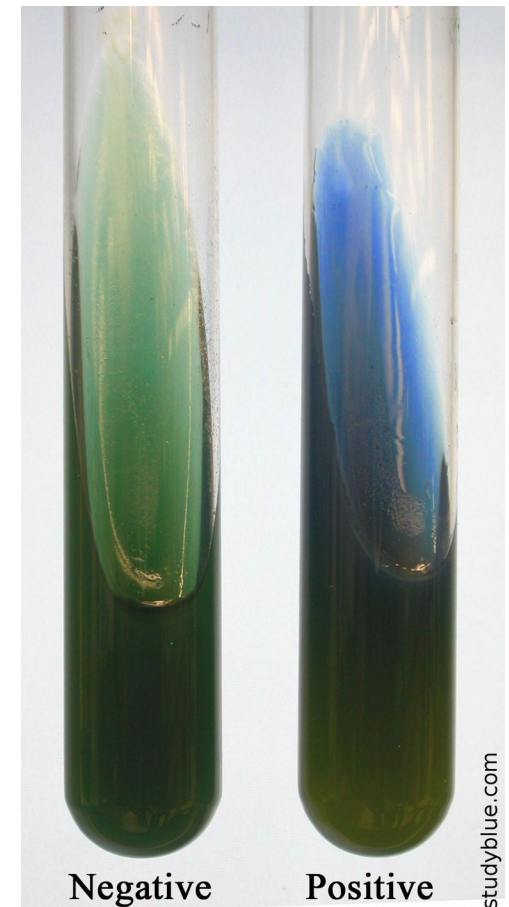


Jednoduché zkumavkové testy (3)

- **substrát je rozpuštěn v tekutině**, přimícháme testovaný kmen → změna zbarvení v celém objemu, nebo jako prstenec u hladiny
 - **arabinózový test** pro rozlišení *E. faecalis* a *E. faecium*
POZ = žlutá (*E. faecium*)
NEG = zelená (*E. faecalis*)
- **kmen je rozmíchán v tekutině**, přidáme proužek napuštěný substrátem
 - **VPT test** pro detekci tvorby acetoinu (POZ = červená)
 - **ONPG test** pro detekci β -galaktosidázy (nezbytná pro utilizaci laktózy); rozlišení rodů *Citrobacter* (POZ = žlutá) a *Salmonella* (NEG = bezbarvá)
 - o-nitrofenol (žlutý) + galaktóza (bezbarvá)

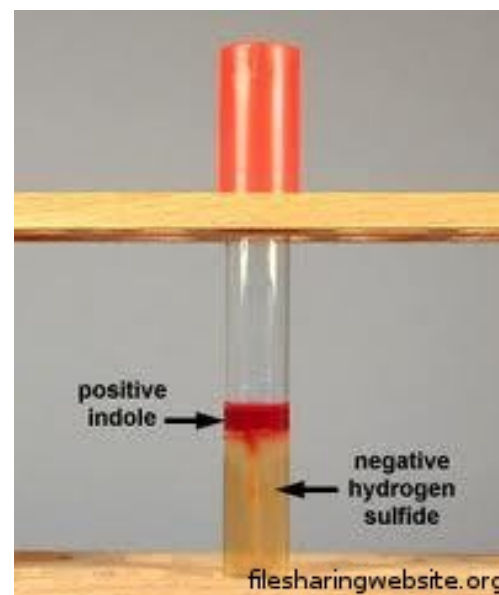
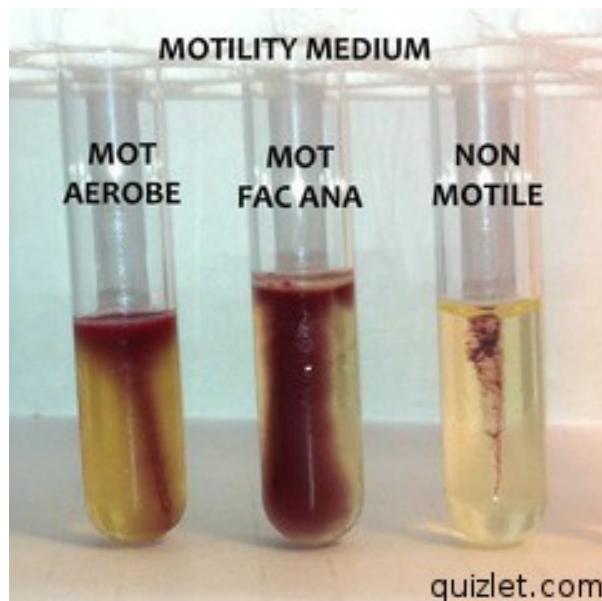
Jednoduché zkumavkové testy (4)

- agar obsahující substrát
 - **Citrát dle Simmonse** pro detekci růstu bakterií na citrátu jako jediném zdroji uhlíku; rozlišení *Enterobacter aerogenes* (POZ = modrá) a *E. coli* (NEG = tmavě zelená)



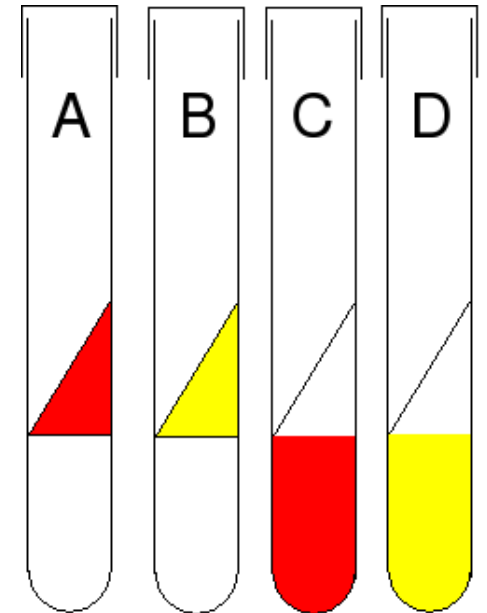
Složité zkumavkové testy

- **test (půda) MIU** (Motility, Indol, Urea)
 - **pohyb** – pohyblivé bakterie se rostou do okolí vpichu, nepohyblivé podél vpichu
 - **tvorba indolu** – po přidání Kovácsova činidla se vytvoří červený prstenec
 - **štěpení urey** – půda se zbarví fialově



Složité zkumavkové testy (2)

- **Hajnova půda** (Kligler's Iron Agar, KIA)
 - štěpení **laktózy** (A = NEG, B = POZ)
 - štěpení **glukózy** (C = NEG, D = POZ)
 - produkce **H₂S** (POZ = zčernání půdy)
 - v případě positivity H₂S v podstatě nelze posoudit fermentaci glukózy!
 - tvorba **plynu** (POZ = potrhaná půda, bublinky, půda vysunutá nahoru)
 - očkování vpichem a tzv. hádkem



fr.wikipedia.org



solabia.fr

Příklad vyhodnocení Hajna+MIU

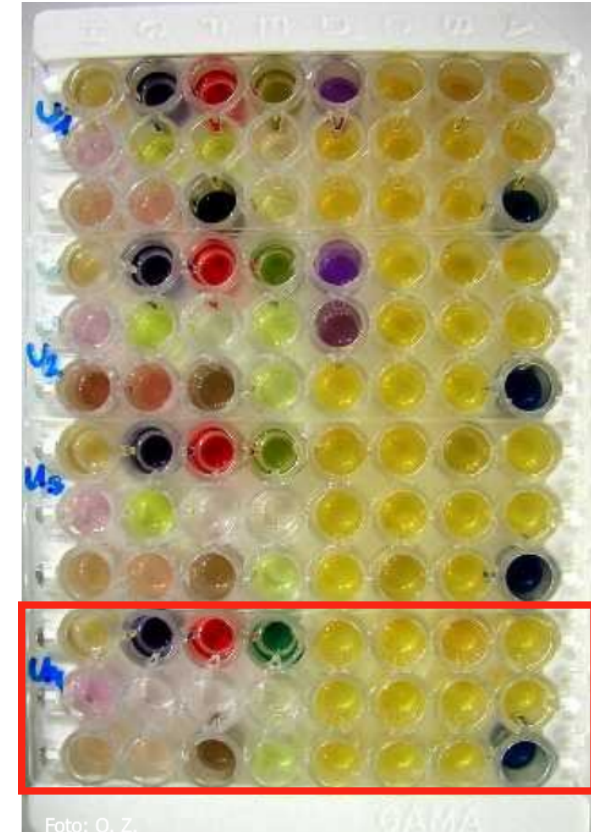
Test	Hajna			MIU		
	Glc	Lac	H ₂ S	Mot	Ind	Ure
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Salmonella enterica</i>	+	-	+	+/-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+/-	(+)	+	-	-

Testy v plastových panelech

- **miniaturizace** sady jednoduchých zkumavkových testů
- počty testů v sadách se liší
- **destičky s lyofilizovanými substráty**
- přidání suspenze bakterií ve fyz. roztoku nebo v dodaném suspenzním médiu
- zbytek bakteriální suspenze se využije jako zkumavkový test (VPT, ONPG)
- **u nás nejběžnější testy** od firmy **Erba Lachema** (např. STAPHYtest 16, STREPTOtest 16, ENTEROtest 16, NEFERMtest 24, apod.)

Testy v plastových panelech (2)

- NEFERMtest 24 (Erba Lachema)
 - jeden test tvoří tři řádky po osmi jamkách
- API 20 E (bioMérieux)
 - princip stejný, provedení se mírně liší



Vyhodnocení destičkových testů

- **oktalové kódy** podle poz. a neg. výsledků
- trojici výsledků se přiřadí číslice od nuly po sedmičku (dvojice výsledků pak číslice nula až tři)
- kód vyhledáme v kódové knize nebo v příslušném softwaru

OXOID MICROBACT™ IDENTIFICATION KITS

MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E

GNB 24E																										
GNB 12A / 12E											GNB 12B															
Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
			6			7			6			0		0			6		6		0					

Result / Resultado / Ergebnis / Résultat / Risultato / Resultat / Resultat / Resultado / Αποτέλεσμα

Sum / Suma / Summe / Somme / Somma / Sum / Summa / Soma / Άθροισμα

Identification / Identificación / Identifikation / Identificazione / Identifikation / Identificering / Identificação / Ταυτοποίηση

E. coli

resource.unisa.edu.au

Další identifikační testy

- zkoumání další enzymové výbavy či faktorů virulence
 - **schopnost koagulovat králičí plazmu**
 - **hyaluronidázový test**
 - **diagnostické použití ATB** (optochin, bacitracin)
 - **chromogenní půdy**
- nové identifikační metody
 - **MALDI-TOF** (ionizace laserem za přítomnosti matrice, spojení s detektorem doby letu)

Chromogenní půdy

- **selektivně diagnostické půdy**
- **chromogen = molekula**, která využita jako substrát mikroblem **mění barvu** → **různé barvy kolonií podle utilizovaného chromogenu**
- **chromogen = substrát + chromofor**
- podobnost s ONPG testem (ONPG je bezbarvý, o-nitrofenol žlutý)
- **URiselect**, půdy pro kandidy, MRSA, listerie atd.

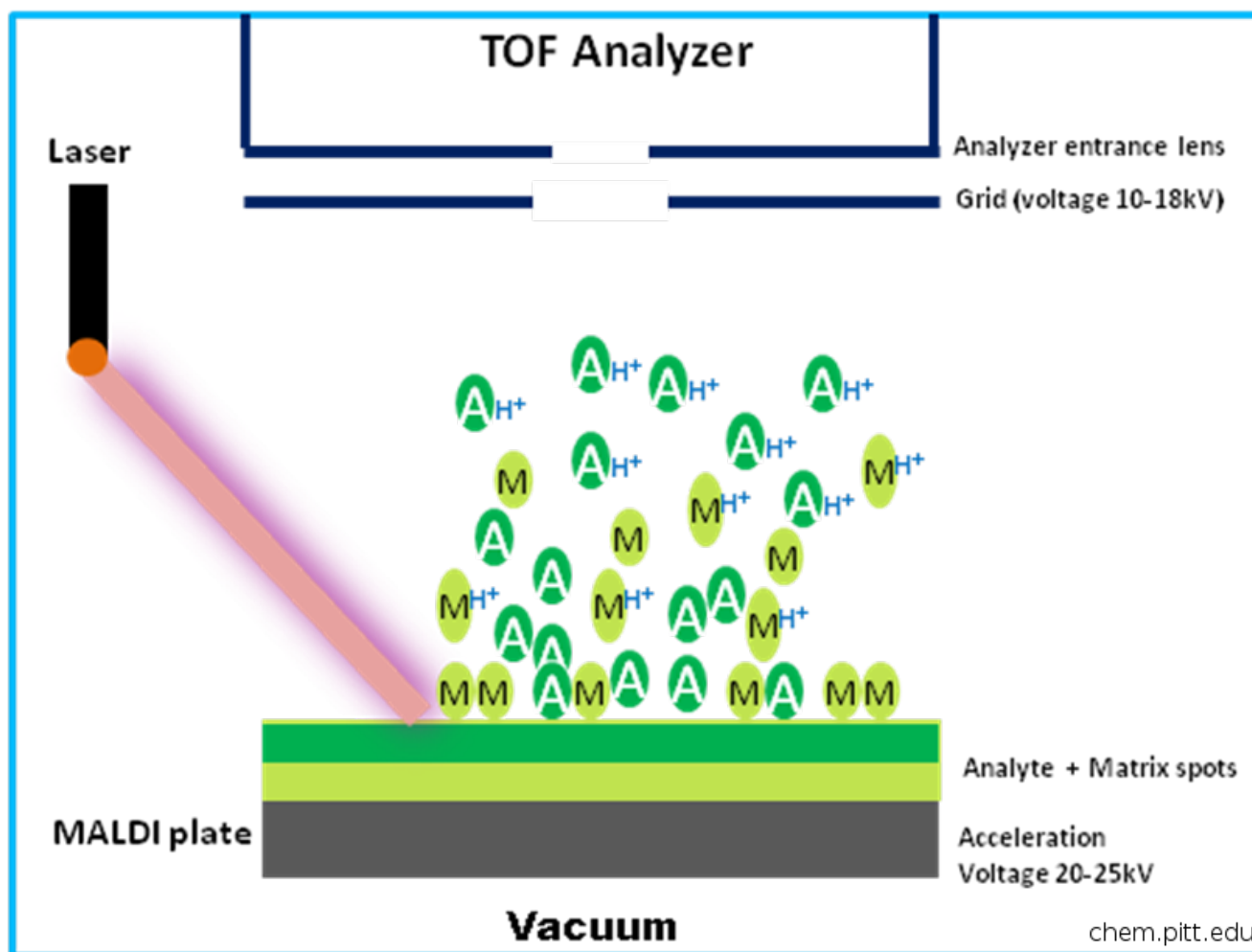


MALDI-TOF

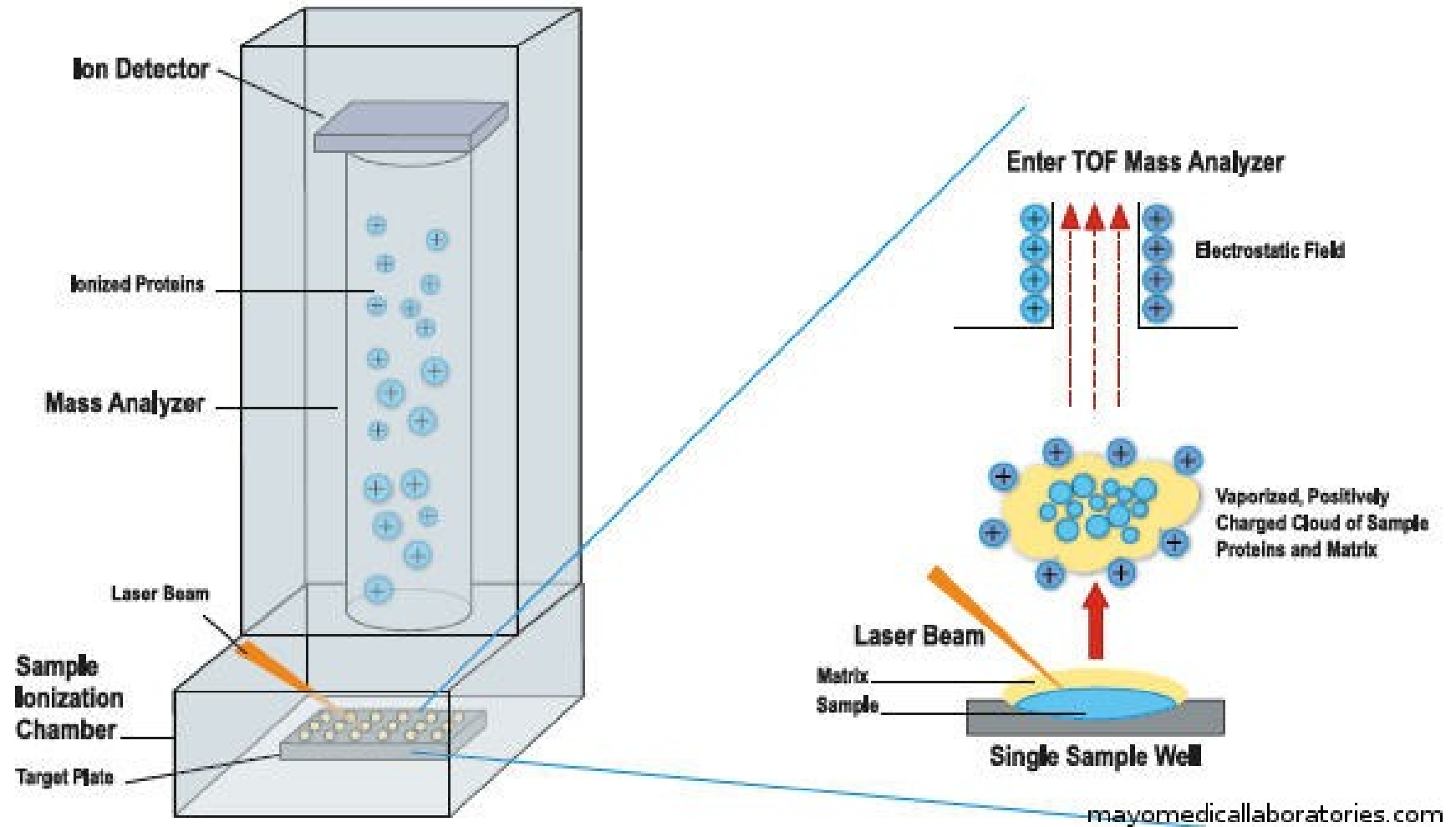
- **rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností** v elektrickém/magnetickém poli
- díky matrici **lze analyzovat i velké biomolekuly** (při přímé ionizaci vzorku laserem dochází ke štěpení molekul nežádoucím způsobem)
- směs vzorku a matrice je ionizována laserem → ionty analyzované látky jsou urychleny silným elektrickým polem → vstupují do trubice detektoru → měření doby letu částice → výpočet poměru molekulové hmotnosti a náboje částice
- **hmotnostní spektrum se poté porovnává se známými profily** uloženými v knihovně

MALDI-TOF (2)

- Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of flight

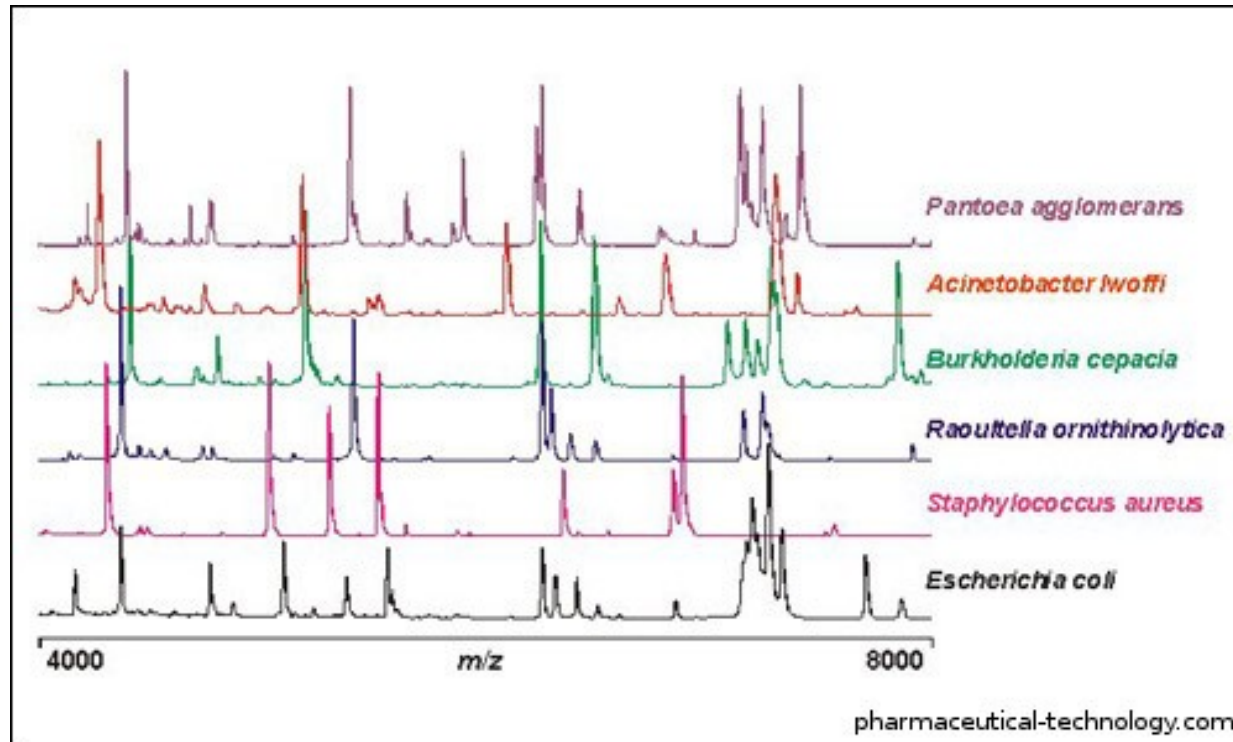


MALDI-TOF (3)

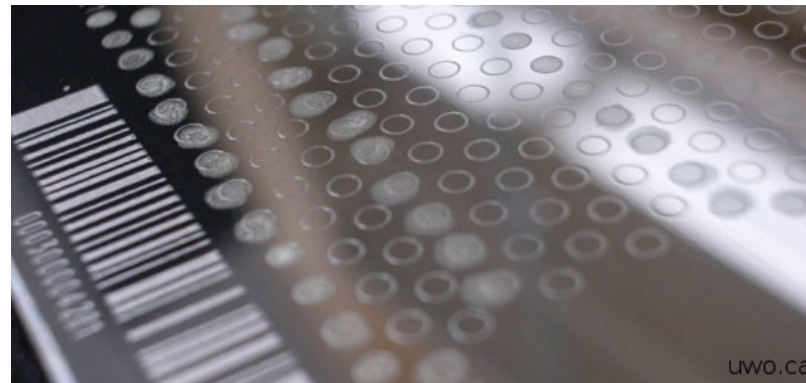


MALDI-TOF (4)

- příklady spekter



vidia-diagnostika.cz



uwo.ca

Úkol 0a: Oxidázový test

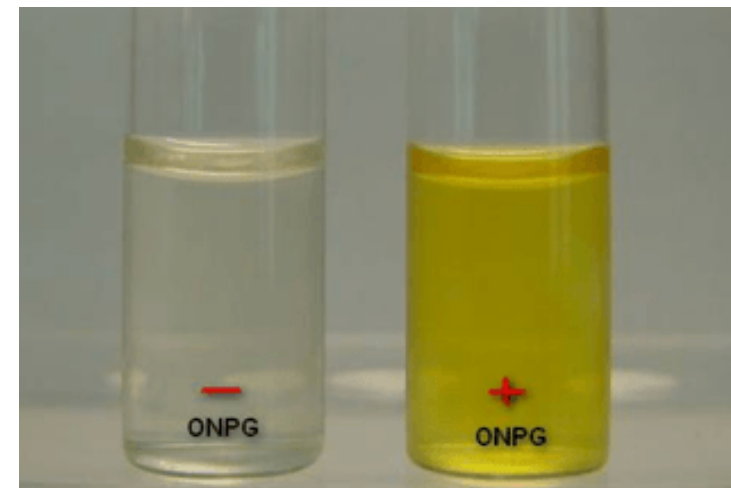
- **filtrační papírek** na diagnostickém proužku napuštěný příslušným reagens **přitiskněte na kolonie** testovaného kmene
- proužek položte do víčka Petriho misky otisknutými koloniemi nahoru
- **POZ = do 30 s** intenzivní **modré** zbarvení
- **OPOŽDĚNĚ POZ = do 2 min** intenzivní modré zbarvení
- **NEG = beze změny** nebo modrání až po uplynutí 2 min



Úkol 0b: 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
- **β -galaktosidáza štěpí ONPG** na o-nitrofenol (žlutý) a galaktózu (bezbarvá)
- **inkubace** v termostatu, výsledek reakce odečítáme po 4 hodinách
- **POZ = zežloutnutí** suspenze
- **NEG = beze změny**



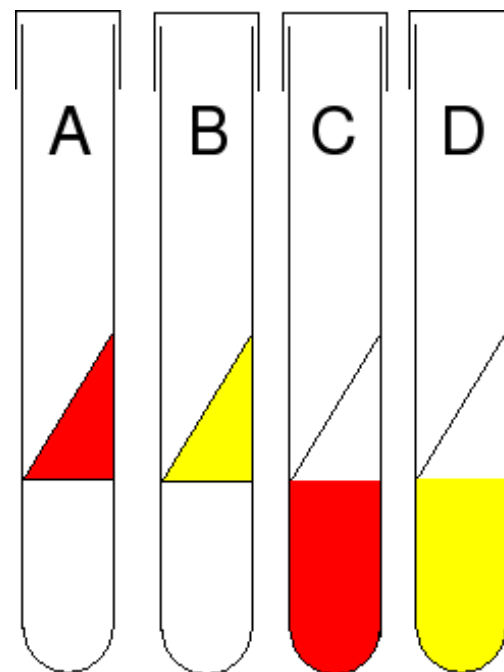
Proteus vulgaris (Left): ONPG Negative
Escherichia coli (Right): ONPG Positive

microbeonline.com

Úkol 0c: Hajnova půda

- **Hajnova půda**

- štěpení **laktózy (nahore)**
(A = NEG, B = POZ)
- štěpení **glukózy (dole)**
(C = NEG, D = POZ)
- produkce **H₂S**
(POZ = **zčernání** půdy)
 - v případě pozitivity H₂S
v podstatě nelze posoudit
fermentaci glukózy!
- tvorba **plynu**
(POZ = **potrhaná** půda,
bublinky, půda vysunutá
nahoru)



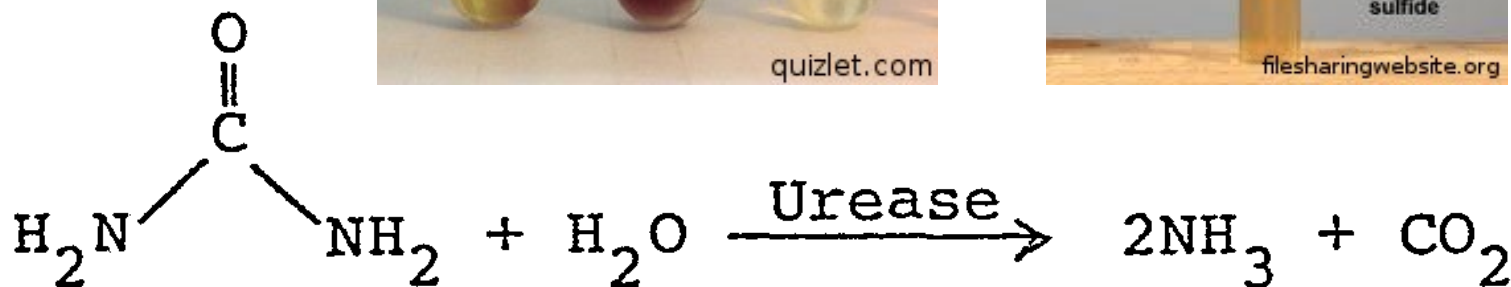
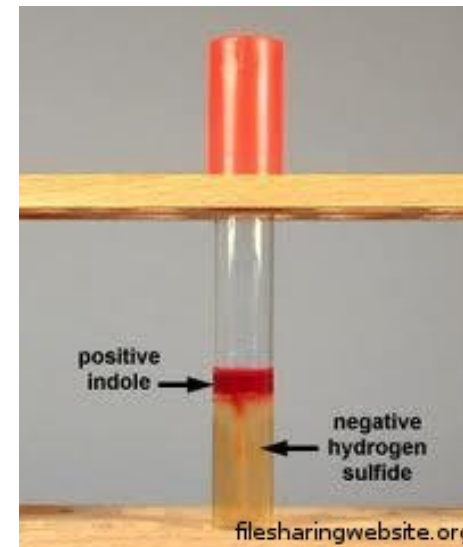
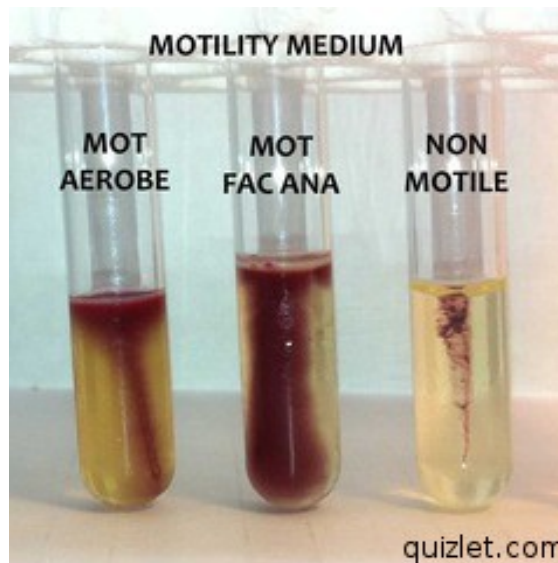
fr.wikipedia.org



solabia.fr

Úkol 0d: MIU

- **pohyb** - pohyblivé bakterie se rostou do okolí vpichu, nepohyblivé podél vpichu
- **tvorba indolu** - **POZ** = **červený** prstenec
- **štěpení urey** - **POZ** = půda se zbarví **fialově**



Úkol 0c+d: Vyhodnocení Hajna+MIU

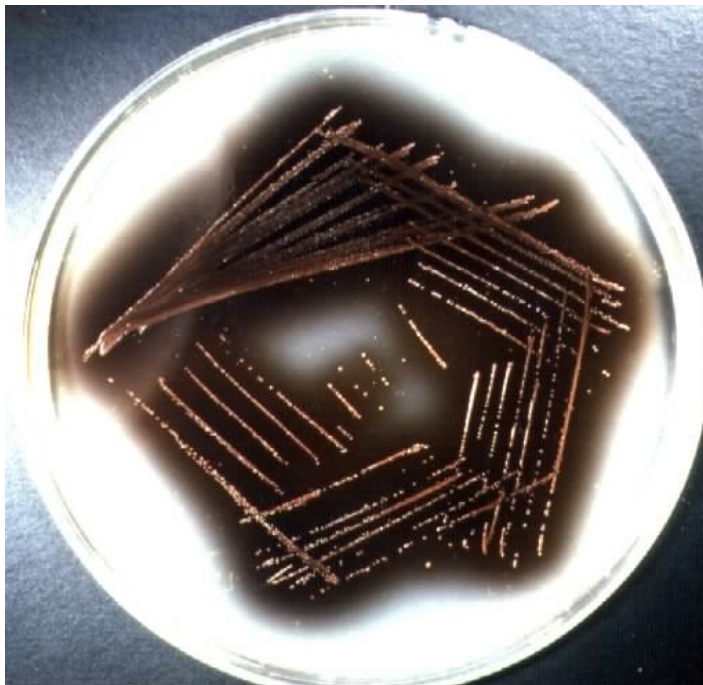
Test	Hajna			MIU		
	Glc	Lac	H ₂ S	Mot	Ind	Ure
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Salmonella enterica</i>	+	-	+	+/-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+/-	(+)	+	-	-

Rod *Enterococcus*

- **G+ koky**, ve dvojicích nebo krátkých řetízcích
- **fakultativně anaerobní, KAT-, OXI-**
- **vysoce odolné: až 6,5 % NaCl, 40 % žluči, azid sodný (půda Slanetz-Bartley), pH 4,8 až 11, půlhodinové zahřátí na 60 °C, primární rezistence na cefalosporiny**
- součástí **normální mikroflóry střeva**
- **původci močových infekcí**, nozokomiální kmeny jsou **často rezistentní** (bakteriémie, katetrové sepse, meningitidy, endokarditidy, inf. žlučových cest, ...)
- ***E. faecalis* (90 %), *E. faecium* (5–10 %)**
- **VRE** – vankomycin rezistentní enterokoky

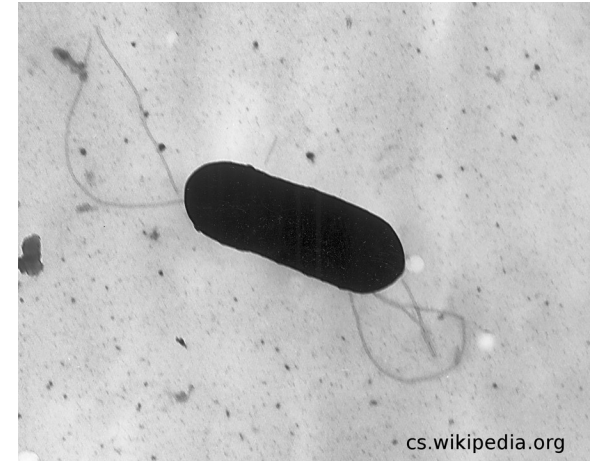
Rod *Enterococcus* (2)

- **G+ koky**, dvojice, řetízky
- **žluč eskulinový agar** (tmavě hnědé až černé drobné kolonie nebo zbarvují dvorec kultivační půdy černě)
- **půda Slanetz-Bartley** (růžové až červené kolonie)



Rod *Listeria*

- **G+ tyčky**, krátké,
- **fakultativně anaerobní, KAT+**
- **odolné** (růst při vyšších koncentracích **NaCl** nebo **žlučových solí, růst při nízkých teplotách**)
- ***L. monocytogenes*** (listeriόza), ***L. ivanovi*** (listeriόza ovcí)
- **listeriόza:**
 - nejčastěji **alimentární infekce** (nedostatečně pasterované mléko, sýry, krůtí a drůbeží maso, zelenina)
 - **nejčastěji probíhá bezpříznakově**, popř. nevolnost, zvracení, průjem



Rod *Listeria* (2)

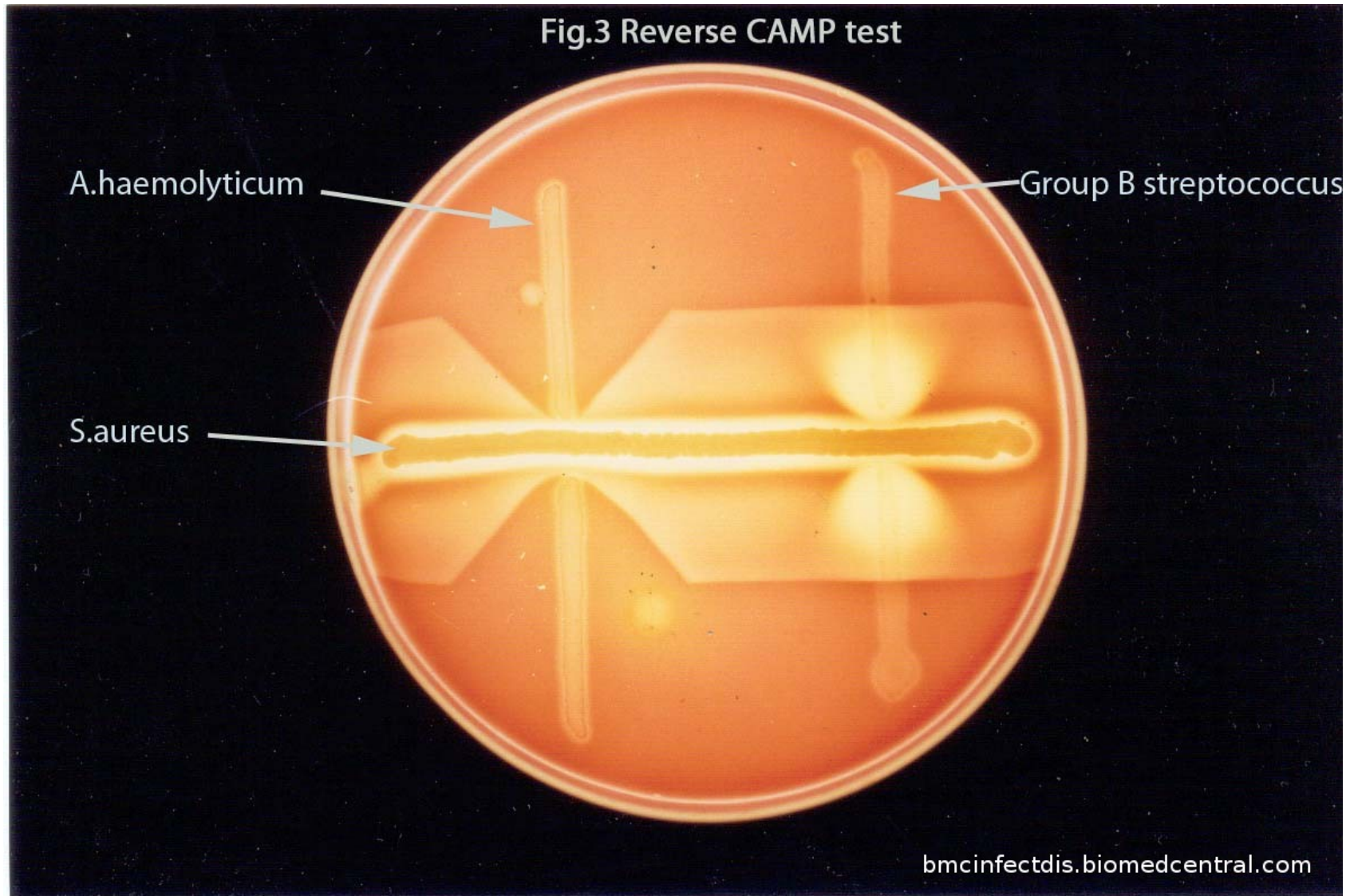
- **listerióza:**

- **nejnebezpečnější u oslabených jedinců** (nemoc, stáří, gravidita)
- infekce ran, meningitida, meningoencephalitida nebo encefalitidami dospělých
- **infekce placenty**, plodových obalů a celkové generalizované **onemocnění plodu** provázeného **sepsí**
- **potraty** ve druhém a třetím trimestru, narození mrtvých nebo těžce nemocných novorozenců (umírají brzy po porodu)

Koryneformní tyčky („difteroidy“)

- termín používaný zpravidla pro **nesporulující G+ tyčky, kyjovitého tvaru**, někdy rovné či zahnuté
- v minulosti všechny v rodu *Corynebacterium*
- vytvořeny nové rody (*Arcanobacterium*, *Rhodococcus*, *Dermatophilus*, *Turicella*, ...)
- *Arcanobacterium haemolyticum* – tonsilitidy, infekce ran; KAT-, reverzní CAMP test
- *Rhodococcus equi* – infekce imunokompromitovaných pacientů (transplantace, AIDS)

Reverzní CAMP test



Rod *Corynebacterium*

- **G+** nesporeující tyčky kyjovitého tvaru, někdy pleomorfní
- typické uspořádání v **palisádách** a tzv. **havraních křídlech**
- fakultativně anaerobní, **půdy s teluričitanem**
- **odolné** k vyschnutí a NaCl, nerostou na agaru bez přídavku krve
- ***Corynebacterium diphtheriae***
- **nedifterická** (=nezáškrťová) **korynebakteria** (součást mikroflóry kůže)



Corynebacterium diphtheriae

- původce **záškrtu** (diftérie)
- **difterický toxin** (nezbytná přítomnost genu *tox*, přenášený β -bakteriofágem, ireverzibilně blokuje proteosyntézu → zánik infikované buňky)
- **pseudomembrána z fibrinu**, pod níž jsou bakterie produkující toxin → nekróza okolních buněk
- **pseudomembrány vznikající ve sliznici HCD** mohou vést k jejich **mechanické obstrukci**, edému sliznice a následně k **udušení**
- **akutní infekce léčena podáním antitoxinů**
- **prevence očkováním (hexavakcína)**

Corynebacterium diphtheriae (2)



pseudomembrána



masivní zvětšení krčních uzlin u diftérie

Nedifterická korynebakteria

- **součástí běžné mikroflóry kůže**
- infekce ran, katérové sepse, postihují vnitřní orgány při průniku do organismu
- ***Corynebacterium jejkeium*:**
 - dříve „korynebakterium skupiny JK“
 - **nozomiální infekce** (až 40 % hospitalizovaných pacientů, zřídka na kůži zdravých jedinců)
 - **katérové sepse**, polyrezistence
- *Corynebacterium pseudotuberculosis* – lymfadenitidy, pneumonie, záněty kůže
- *Corynebacterium urealyticum* – pyelonefritidy, cystitidy

Rod *Bacillus*

- **G+ tyčky, robustní, rovné až konkávní konce**, tvoří **endospory**, často pohyblivé, obvykle KAT+
- většina zástupců běžně přítomna v prostředí (tvorba endospor)
- v klinickém prostředí **časté kontaminace**
- podle **morfologie spor** rozdělení do tří skupin:
 - oválné spory, nevyklenují buňku (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, ...)
 - oválné spory, vyklenují buňku (*G. stearothermophilus*, *B. polymyxa*, ...)
 - sférické spory, vyklenují buňku (*B. sphaericus*)

Rod *Bacillus* (2)

- rozdělení dle **morfologie endospor:**



ex : *B. Subtilis*
B. Cereus
B. Thuringiensis
B. Anthracis



ex : *B. Polyxyma* (fixe le N₂)



ex : *B. Pasteurii* (dégrade l'Urée)

Bacillus anthracis

- **obligátní patogen, původce anthraxu** (sněť slezinná, uhlák)
- **plicní anthrax**: spory pronikají do plicních alveolů → makrofágy do mediastinálních uzlin (zpočátku připomíná chřipkovité onemocnění) → hemoragická nekróza uzlin a bakteriémie → septický šok a respirační selhání; bez včasného podání ATB letalita až 100 %
- **kožní anthrax**: papula v místě vstupu → vřed se silným edémem a hemoragickou nekrózou v centru → regionální lymfadenitida → sepse u neléčení infekce
- **střevní anthrax**: nauzea, zvracení, horečka, bolesti břicha, krvavé průjmy → sepse; letalita až 50 %
- **lékem volby jsou penicilinová ATB**

Další druhy rodu *Bacillus*

- ***B. cereus*** – součástí střevní mikroflóry, alimentární enterotoxikózy při přemnožení; devastující infekce oka
- ***B. subtilis*, *Geobacillus*** (dříve *Bacillus*)
stearothermophilus – spory přežívají vysoké teploty, indikátory účinnosti sterilizátorů

Léčba infekcí způsobených enterokoky a G+ tyčkami

- enterokoky a listerie rezistentní na cefalosporiny
- *E. faecalis* ampicilin, *E. faecium* je k ampicilinu primárně rezistentní
- ko-trimoxazol, doxycyklin, jako rezerva vankomycin
- **vankomycin rezistentní kmeny (VRE)**
 - zejména u hematologických pacientů
 - **linezolid** (oxazolidinony, inhibice proteosyntézy)
 - **quinupristin/dalfopristin** (streptograminy, inhibice proteosyntézy)

Enterokoky a G+ tyčky: přehled kultivace a mikroskopie

	Enterokoky	Listerie	Koryneform.	<i>Bacillus</i>
Mikroskopie	G+ koky v krátkých řetízcích	G+ tyčky, mohou tvořit řetízky či palisády	G+ tyčky skládající se vedle sebe (palisády, „havraní křídla“)	G+ robustní tyčky, sporující (nemusí být viditelné)
Kultivace	šedavé, velké asi jako <i>S.</i> <i>agalactiae</i> , většinou bez hemolýzy, ale i s virid. či hemol.	podobné entero- kokům, hemolýza je či není	velmi drobné kolonie (podobné mouce)	plstovité kolonie, někdy i výrazná hemolýza

Diagnostika enterokoků

- **biochemické testy: KAT-**, štěpení arabinosy (*E. faecalis* neštěpí, půda je **zelená**, *E. faecium* štěpí, **žlutá**), ENCOCCUStest
- **antigenní analýza**: zpravidla se nepoužívá (dle Lancefieldové antigenní **skupina D**)
- **citlivost** lze testovat na běžném **MH agaru** bez krve
- **speciální půdy na skrínig VRE**

Diferenciální diagnostika enterokoků

- **Gramovo barvení:** grampozitivní koky, grampozitivní tyčinky a ostatní bakterie
- **stafylokoky:** **KAT+**, růst na agaru s 10 % NaCl
- **streptokoky:** nepřítomnost růstu na Slanetz-Bartleyho či žluč-eskulinové půdě, popř. PYR testem (kromě *S. pyogenes* negativní)
- **enterokoky:** **růst na Slanetz-Bartleyho či žluč-eskulinové půdě**, PYR test pozitivní
- vzájemné rozlišení enterokoků arabinózovým testem nebo složitějším ENCOCCUS testem

Diagnostika G+ tyček

- **biochemické testy: KAT+** (*Arcanobacterium* KAT-), biochemicky lze rozlišovat koryneformní tyčinky navzájem (API Coryne, Remel)
- **růst při nízkých teplotách**, vysokých koncentracích NaCl a hemolytické interakce se používají v diagnostice **listerií**
- **průkaz antigenu** - např. **průkaz difterického toxinu Elekovým testem**

Diferenciální diagnostika G+ tyček

- **u G+ tyčinek ale není jednoznačný algoritmus!**
- **Gramovo barvení:** odliší grampozitivní tyčinky od ostatních (bacily robustní tyčky, často tvorba endospor)
- bacily kultivačně charakteristické (velké plstovité kolonie)
- druhové určení je možné biochemickými testy, testy citlivosti na antibiotika apod.
- **pokud tyčky nesporulují a nejsou robustní**, mělo by jít o **listerie** nebo některou z **koryneformních tyček** (samotná nepřítomnost endospory není důkaz!)
- **další rozlišení je možné biochemicky, růstem** při různých teplotách, testy **hemolytických interakcí** (synergismů, antagonismů) apod.

Úkol 1: Mikroskopie kmenů

- **obarvěte podle Grama osm kmenů**
- **G+ koky, G+ tyčky, jeden kmen G- tyčka**
- ***Bacillus* - robustní tyčinky**, někdy s nálezem centrálně až subterminálně uložených **endospór**, jež mohou, ale nemusí vyklenovat tyčku
- ***Listeria*** - mikroskopicky drobnější než *Bacillus*, **neuspořádané v palisádách**, ale spíše v krátkých řetízcích
- ***Corynebacterium*** - kyjovité, uspořádané do palisád či „havraních křídel“

Úkol 2: Morfologie kolonií G+ koků a tyčinek

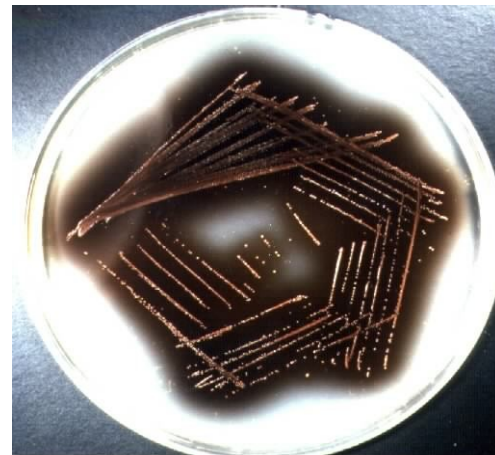
- **popište kolonie, odhadněte rody bakterií**
- ***Bacillus*** – **velké**, ploché, suché, **plstovité kolonie**, „rozlézající“ se po povrchu agaru, někdy s výraznou hemolýzou, jindy zcela bez ní
- ***Listeria*** – **bezbarvé až naředlé kolonie**, velmi podobné enterokokovým, bez hemolýzy nebo s hemolýzou
- ***Corynebacterium*** (a blízké rody) – šedavé nebo bělavé kolonie podobné stafylokokovým, ale někdy i o hodně menší, většinou bez hemolýzy

Úkol 3: Některé běžné biochemické a kultivační testy

- **úkol 3a: katalázový test** (*Listeria*, *Corynebacterium* i *Bacillus* pozitivní)
- **úkol 3b: růst na Slanetz-Bartleyho půdě** (pro enterokoky, pozitivní jsou ty, které nejen rostou, ale navíc mají typickou růžovou až červenohnědou barvu)
- **úkol 3c: růst na žluč-eskulinové půdě** (pro enterokoky a listerie, pozitivní jsou černé kolonie)



medmicro.info;
prof. MVDr. Boris
Skalka, DrSc.



Úkol 4: Vzájemné rozlišení enterokoků

- **úkol 4a: arabinózový test** pro druhové rozlišení dvou nejběžnějších druhů enterokoků (*E. faecalis* neštěpí, půda je **zelená**, *E. faecium* štěpí, **žlutá**)
- **úkol 4b:**

MALDI-TOF (dva enterokoky a jedna koryneformní tyčka)

ENCOCCUStest

Úkol 5: Další metody k diagnostice listerií

- **úkol 5a: růst listerií při 4 °C (listerie je schopna růst při nízkých teplotách; některé druhy yersinií a pseudomonád také.)**
- **úkol 5b: demonstrace růstu *Listeria monocytogenes* na chromogenní půdě (půda ALOA, modré zbarvení všech kolonií listerií, přičemž patogenní druhy navíc mají kolem sebe halo (odlišně zbarvené okolí kolonie).**

Úkol 5b: Chromogenní půda ALOA



modré zbarvení všech kolonií listerií, **patogenní druhy mají kolem sebe halo**

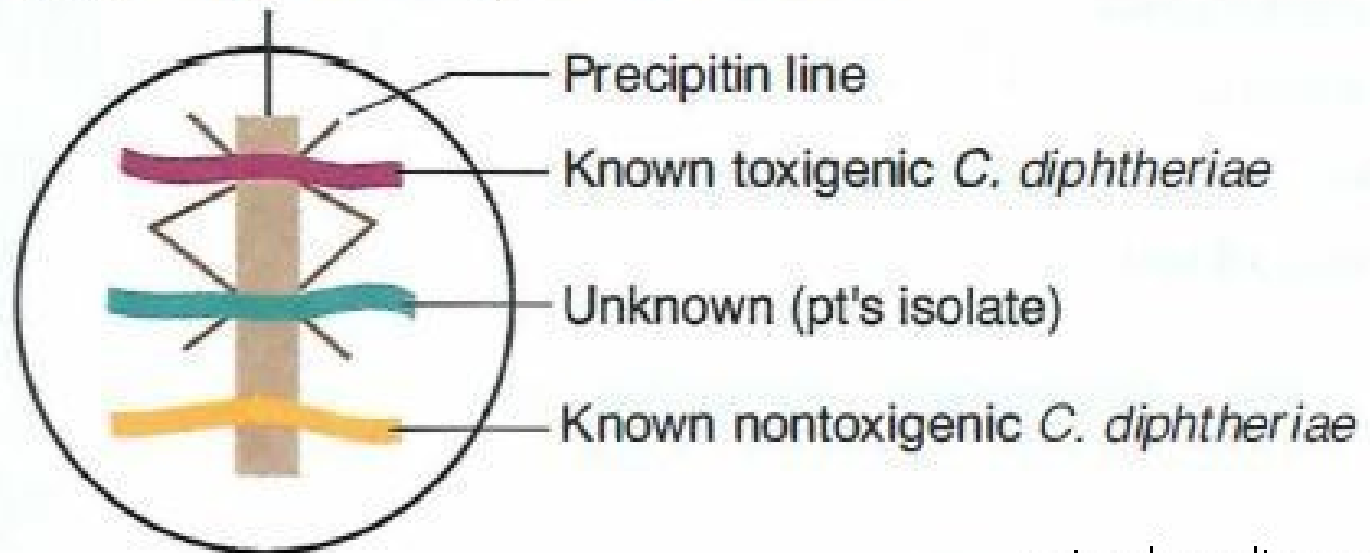
Úkol 6: Vztah enterokoků a G+ tyčinek k antibiotikům

- **úkol 6a:** odečtíte diskový difuzní test
- **úkol 6b:** demonstrace testu citlivosti u kmene *Enterococcus faecium* (k ampicilinu primárně rezistentní)
- **úkol 6c:** demonstrace kmene VRE

Úkol 7: Demontrace Elekova testu

- **precipitace mezi toxinem** z toxického kmene a **antitoxinem** z papírového proužku napuštěného antisérem

Filter paper strip with *C. diphtheriae* antitoxin



microbeonline.com

Po tomto cvičení byste měli umět:

- vysvětlit význam a podstatu biochemických identifikačních metod v mikrobiologii
- popsat nejběžnější testy, které se v mikrobiologii využívají a spojit je s konkrétní příklady využití v diagnostice a umět provést nejběžnější testy
- popsat zástupce rodu *Enterococcus* a hlavní klinicky významné G+ tyčky, vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- diskutovat význam VRE, jejich diagnostické a terapeutické možnosti
- obecně vysvětlit princip a význam precipitace v agaru a popsat Elekův test