**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

## Na stole máte kmeny označené písmeny. Obarvěte je podle Grama a určete, který z nich není grampozitivním kokem. Nátěry jednotlivých kmenů označte na sklíčku pomocí tužky na sklo příslušným písmenem. Nasnímejte výsledky a zapište je do tabulky. U kmenů, které nejsou G+ koky, proškrtněte zbylou část tabulky.

## 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. 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. Zapište výsledek do tabulky.

## Úkol 3: Kultivace na krevním agaru

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“. Výsledek barevně zakreslete a zapište do tabulky (zde stačí ve formě + / –)

 KMEN \_\_

KMEN \_\_

**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.

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

### b) Biochemické určení „ústního“ streptokoka

U kmene, který jste v předchozím úkolu určili jako „ústního“ streptokoka, druhově vyhodnoťte biochemický mikrotest (STREPTOtest 16), využívajíce postupů, které znáte z jarního semestru.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 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 |

## 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 proužkový test, podobný oxidázovému. 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 *Streptococcus agalactiae* i non-A-non-B streptokoky.

*Poznámka: Někdejší* ***bacitracinový test*** *se dříve používal místo PYR-testu. Jeho princip je shodný s principem optochinového testu, jen s jiným antibiotikem. Pro nedostatečnou specificitu byl již téměř opuštěn.*

Vyplňte následující tabulku, včetně zakreslení výsledku PYR testu u všech tří testovaných kmenů.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Kmen (zapište písmeno) | Kmen (zapište písmeno) | Kmen (zapište písmeno) |
|  |  |  |
| Interpretace: negativní – pozitivní*(nehodící se škrtněte)* | Interpretace: negativní – pozitivní*(nehodící se škrtněte)* | Interpretace: negativní – pozitivní*(nehodící se škrtněte)* |

## 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 (na následující stránce):

kmen \_\_\_

kmen \_\_\_

kmen \_\_\_

## c) 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).**

G

F

D

C

B

A

## Úkol 6: Testy citlivosti na antibiotika u streptokoků

Vyhodnoťte testy citlivosti (difusní diskové testy) na antibiotika u těch kmenů streptokoků, které považujete za patogeny či možné patogeny; předpokládejme pro jednoduchost, že se jedná o kmeny z horních cest dýchacích. U kmene určeného jako non-A-non-B streptokok pro jeho malou patogenitu citlivost neurčujeme; u kmene určeného jako *S. agalactiae* (typický původce močových infekcí) použijeme sadu antibiotik určenou pro léčbu močových infekcí (obsahuje např. nitrofurantoin).

**Zóny citlivosti měřte od kolonií ke koloniím, nikoli od hemolýzy k hemolýze (rozměr zóny by byl menší).**

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Kmen **(zapište písmeno kmene)** 🡪 |  |  |
| Antibiotikum | Citlivý pokud je | Intermedi-ární pokud | Rezis-tentní | ∅ zóny (mm) | Interpre-tace | ∅ zóny (mm) | Interpre-tace |
| PenicilinP | ≥ 18 mm |  | < 18 mm |  |  |  |  |
| ErythromycinE | ≥ 21 mm | 18–20 mm | < 18 mm |  |  |  |  |
| ClindamycinDA | ≥ 17 mm |  | < 17 mm |  |  |  |  |
| ChloramfenikolC | ≥ 19 mm |  | < 19 mm |  |  |  |  |
| Tetracyklin\*TE | ≥ 23 mm | 20–22 mm | < 20 mm |  |  |  |  |
| VankomycinVA | ≥ 13 mm |  | < 13 mm |  |  |  |  |

|  |  |
| --- | --- |
| 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: Diagnostika pozdních následků streptokokových infekcí – vyšetření ASLO

***Princip – opakování z J07:*** *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

Slovníček k dnešnímu tématu:

|  |  |
| --- | --- |
| V tomto protokolu (a v některých učebnicích) | V některých jiných učebnicích |
| viridace | alfa-hemolýza |
| částečná hemolýza | beta-hemolýza |
| úplná hemolýza |
| žádná hemolýza/nepřítomnost hemolýzy | gama-hemolýza |