

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 Kultivace (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. Obarvíte je podle Grama a určete, který z nich není gram pozitivním 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

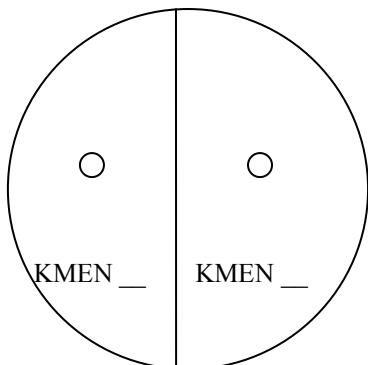
Na miskách s krevním agarem máte opět všechny kmeny. Ty, které jste vyloučili v úkolech 1 a 2, nemusíte popisovat, pro porovnání se však na ně podívejte. Zapište vlastnosti kmenů do tabulky.

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: Blížeji 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 šedozelený v důsledku jejich viridace. Nicméně s ohledem na určité rozdíly ve vzhledu kolonií není barva úplně stejná pro oba kmene. 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), využívající 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 <i>Streptococcus</i>									% 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 specifitu byl již téměř opuštěn.

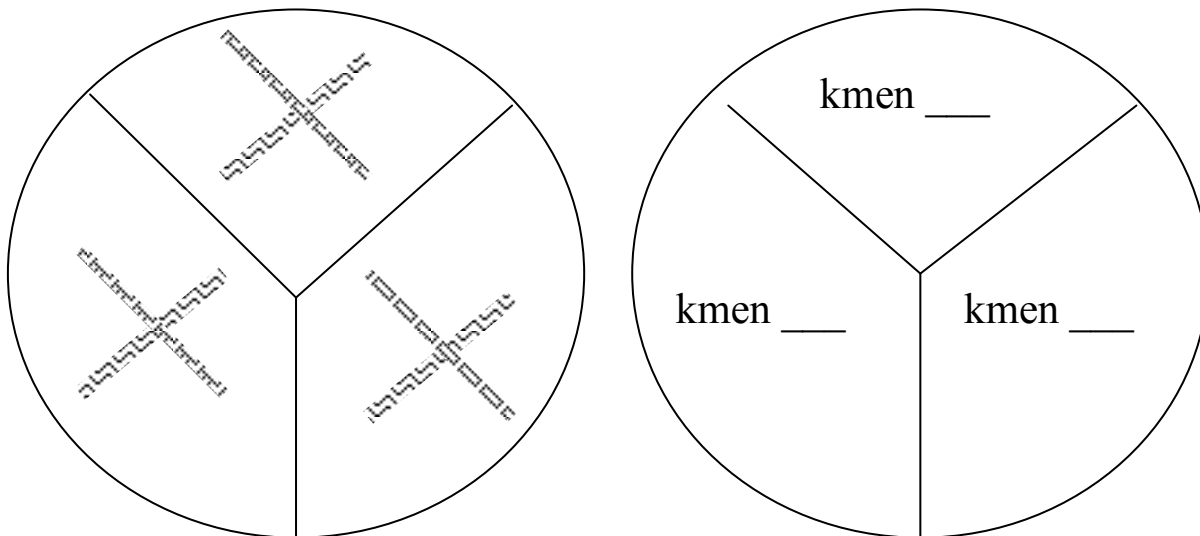
Vyplňte následující tabulku, včetně zakreslení výsledku PYR testu u všech tří testovaných kmenů.

Kmen (zapište písmeno)	Kmen (zapište písmeno)	Kmen (zapište písmeno)
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Interpretace: negativní – pozitivní (nehodící se škrtněte)	Interpretace: negativní – pozitivní (nehodící se škrtněte)	Interpretace: negativní – pozitivní (nehodící se škrtněte)

b) CAMP test

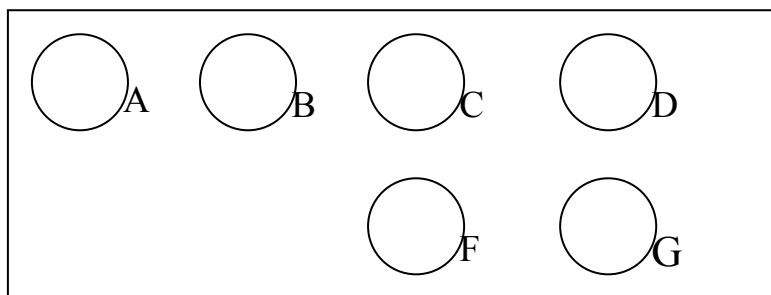
Poznámka: CAMP test nemá nic společného s cyklickým adenosinmonofosfátem. Nazývá se podle jmen svých objevitelů. Proto se také píše CAMP test a nikoli cAMP test.

CAMP test je založen na hemolytickém synergismu mezi kmenem *S. aureus* produkujícím beta-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 (na následující stránce):



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)**.



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

Kmen (zapište písmeno kmene) →							
Antibiotikum	Citlivý pokud je	Intermediární pokud	Rezistentní	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace
Penicilin P	≥ 18 mm		< 18 mm				
Erythromycin E	≥ 21 mm	18–20 mm	< 18 mm				
Clindamycin DA	≥ 17 mm		< 17 mm				
Chloramfenikol C	≥ 19 mm		< 19 mm				
Tetracyklin* TE	≥ 23 mm	20–22 mm	< 20 mm				
Vankomycin VA	≥ 13 mm		< 13 mm				

Kmen (zapište písmeno kmene) →					
Antibiotikum	Citlivý pokud je	Intermediární pokud	Rezistentní	Ø zóny (mm)	Interpretace
Penicilin P*	≥ 18 mm	X	< 18 mm		
Tetracyklin* TE	≥ 23 mm	20–22 mm	< 20 mm		
Vankomycin VA	≥ 13 mm	X	< 13 mm		
Nitrofurantoin F	≥ 15 mm	X	< 15 mm		

*interpretuje se jako ampicilin

Úkol 7: Diagnostika pozdních následků streptokokových infekcí – vyšetření ASLO

Princip – opakování z J07: 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 projevuje 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+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
P5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		

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