

Téma P01: Diagnostika stafylokoků**K nastudování: Rod *Staphylococcus*. (z internetu, učebnic apod.)****Z jarního semestru: Mikroskopie, Kultivace, Biochemická identifikace.****Úkol 1: Mikroskopie infekčního materiálu**

V mikroskopu sledujte preparát obarvený podle Grama. Popište a zakreslete sledované útvary. Všímejte si přítomnosti bakterií (jejich tvaru, barvitelnosti a množství) dále také leukocytů, epitelii a vzájemného poměru mezi nimi.

Popis (napište názvy útvarů a spojte je šipkami s objekty nakreslenými vlevo)

Tabulka pro souhrn výsledků úkolů 2 až 7 (k postupnému vyplnění):

| Kmen | | K | L | M | N |
|--------------------------------------|----------|---|---|---|---|
| Gramovo barvení – Úkol 2 | | | | | |
| Úkol 3: Kultivace (krevní agar) | Velikost | | | | |
| | Barva | | | | |
| | Tvar | | | | |
| | Profil | | | | |
| | Hemolýza | | | | |
| | Jiné | | | | |
| Úkol 4: růst na KA + 10 % NaCl | | | | | |
| Úkol 5: kataláza (pište „+“ či „-“) | | | | | |
| DÍLČÍ ZÁVĚR | | | | | |
| Úkol 6a: Test clump. faktor (+/-) | | | | | |
| Úkol 6b: Plasma-koaguláz. test (+/-) | | | | | |
| Úkol 6c: Test hyaluronidázy (+/-) | | | | | |
| Úkol 7: STAPHYtest 16 | | | | | |
| KONEČNÝ ZÁVĚR | | | | | |

Pokud některý test u některého kmene neprovádíte, proškrtněte ho. Konečný závěr ale napište pro všechny.

Úkol 2: Mikroskopie kultur mikroorganismů

Obarvěte podle Grama čisté kultury předložených mikrobů. Výsledky pozorování zakreslete (↓) a zapište (↑).

| Kmen K | Kmen L | Kmen M | Kmen N |
|--------|--------|--------|--------|
| | | | |

Úkol 3: Růst na krevním agaru

Vyplňte tabulku na první straně v řádcích „Úkol č. 3“. Do „jiných“ napište to zajímavé, co se nevejde jinam.

Úkol 4: Růst bakterií na krevním agaru s 10 % NaCl

Zhodnoťte schopnost růstu předložených kmenů na krevním agaru s 10 % NaCl, který slouží jako selektivní půda pro stafylokoky. Zapište „+“ pokud kmen roste a „-“ pokud neroste.

Úkol 5: Katalázový test

Prokažte přítomnost enzymu katalasy. Setřete mikrobiologickou kličkou kolonie předložených kmenů a vnesťte je do kapky 3% H₂O₂ na podložním skličku. Zaznamenejte reakci u všech kmenů. Do tabulky pište „+“ a „-“.

Pozitivitu charakterizují _____, zatímco _____ je negativní.

Nyní vyplňte v tabulce řádek „Dílčí závěr“. Napište STAF, pokud se kmen ukázal být stafylokokem, a JINÝ, pokud je to něco jiného.

Úkol 6: Testy pro diferenciaci *S. aureus*

6a) Test na clumping faktor (test vázané plasmakoagulázy)

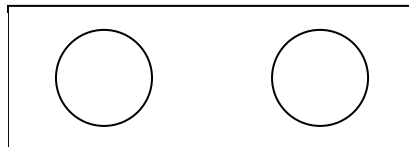
Na podložní skličku kápněte kapku ředěné králičí plazmy. Pomocí sterilní mikrobiologické kličky v ní suspendujte vyšetřovaný kmen stafylokoka. Přítomnost plasmakoagulázy se projeví aglutinací bakteriálních buněk. Výsledek vyšetření zakreslete a zapište sem i do tabulky.

Kmen _____

(písmeno)

pozitivní – negativní

(škrtněte co neplatí)



Kmen _____

(písmeno)

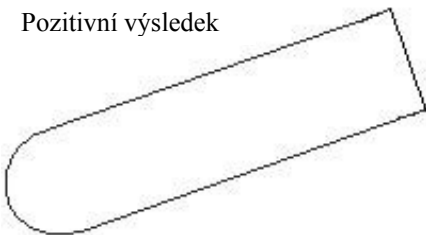
pozitivní – negativní

(škrtněte co neplatí)

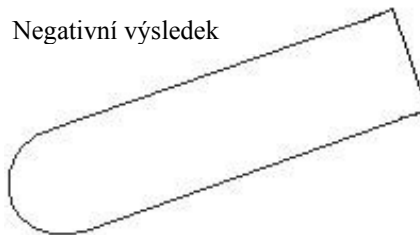
6b) Plasmakoagulázový test (test volné plasmakoagulázy)

Do 0,5 ml 10× ředěné králičí plazmy bylo suspendováno několik kolonií vyšetřovaného kmene stafylokoka. Suspenzi inkubujeme v termostatu při 37 °C. Výsledek se odečítá po 1, 2 a 24 hodinách. Jako pozitivní reakce se hodnotí, pokud dojde ke koagulaci králičí plazmy ve zkumavce, tj. dojde k zrosolování celého obsahu zkumavky, příp. alespoň části. Zapište a zakreslete výsledek této reakce u vybraných kmenů po 24 hodinách inkubace. (Zkumavka je v nákresu záměrně nakloněná, aby bylo vidět, zda je uvnitř hladina tekutiny.)

Pozitivní výsledek



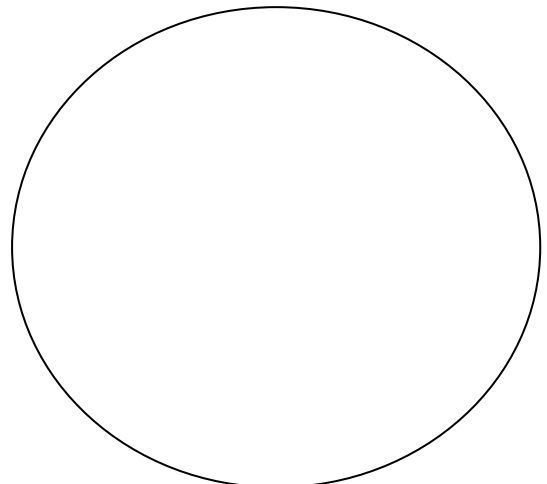
Negativní výsledek



6c) Detekce hyaluronidázy

Na krevní agar jsme naočkovali asi 2 cm široký pás *Streptococcus equii*, bakterie, která tvoří silné pouzdro s obsahem kyseliny hyaluronové. Kolmo k tomuto pásu byla naočkována čára vyšetřovaného kmene stafylokoka. Pokud je příslušným kmenem stafylokoka hyaluronidasa produkována, difunduje do okolí a do druhého dne způsobí lýzu pouzdra *Streptococcus equii*. To se projeví půlkruhovou zónou „ztráty slizovitosti“ v pásu naočkováného *Streptococcus equii*. Zakreslete výsledek reakce u dvou kmenů (včetně pozitivní a negativní kontroly) a popište.

Pozor! V tomto úkolu nejde o hemolýzu kmenů. Do obrázku ji sice – pokud ji pozorujete – můžete zakreslit, není to však pro tento úkol podstatné. Dbejte pokynů učitele a úkol provádějte až po jeho výkladu!



Úkol 7: Blížejší určení stafylokoků pomocí biochemického mikrotestu (STAPHYtest 16)

Pro identifikaci stafylokoků je určena sada biochemických testů. Podle tabulky v návodu k použití nebo podle barevné srovnávací šablony odečtete výsledky jednotlivých reakcí. Výsledky testů pro jednotlivé kmeny запиšte a na základě interpretačních tabulek zjistíte, o které druhy stafylokoků jde. Začátek výsledků pro první kmen máte předvyplněn. Nezapomeňte vyplnit též procento pravděpodobnosti a index typičnosti!

| | Zkum. | První řádek vlastního testu s 8 jamkami | | | | | | | | | Druhý řádek vlastního testu s 8 jamkami | | | | | | | |
|----------|-------|---|----|----|----|----|----|---------------------------------------|----|----|---|----|--------------|----|----|---------|----|--|
| | VPT | 1H | 1G | 1F | 1E | 1D | 1C | 1B | 1A | 2H | 2G | 2F | 2E | 2D | 2C | 2B | 2A | |
| K | + | + | + | - | - | - | + | + | - | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | |
| | 7 | | | 0 | | | 3 | | | | | | | | | | | |
| | Kód: | | | | | | | Identifikace <i>Staphylococcus</i> | | | | | % pravděpod. | | | T index | | |
| L | 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>Staphylococcus</i> | | | | | % pravděpod. | | | T index | | |

Úkol 8: Citlivost stafylokoků k antibiotikům

Zjistíte citlivost předložených kmenů stafylokoků k vybraným antibiotikům, pomocí diskového difusního testu. Citlivost k předkládaným antibiotikům zhodnoťte na základě srovnání změřeného průměru inhibiční zóny s příslušnou hraniční zónou. Seznam testovaných antibiotik a hodnoty jejich hraničních zón najdete v příložené tabulce. Výsledky testu pro jednotlivá antibiotika (průměr inhibiční zóny i interpretaci) запиšte. V případě, že zóna citlivosti není vůbec přítomna, proškrtněte průměr zóny a rovnou запиšte „R“.

| Antibiotikum (plný název, ne zkratka) | <i>S. aureus</i> | | <i>S. epidermidis</i> | |
|---------------------------------------|------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | Průměr zóny (mm) | Interpretace* | Průměr zóny (mm) | Interpretace* |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

*zapisujte C = citlivý, R = rezistentní, případně D = dubiozní (hraniční zóna, velikost právě rovna referenční)

