

Mr. and Mrs. MRSA

STAFYLOKOKY praktikum č. 1

Lékařská mikrobiologie – cvičení
Mikrobiologický ústav LF MU

Před tímto cvičením byste měli umět:

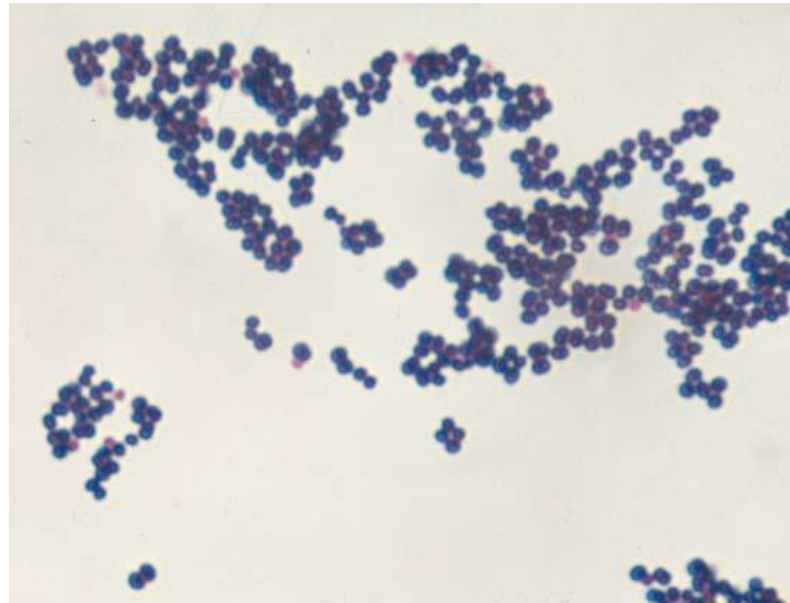
- ▶ Práce s mikroskopem
- ▶ Gramovo barvení
- ▶ Zásady práce v mikrobiologické laboratoři

- ▶ Vyplněný odpovědník a vytištěný protokol (před každým cvičením)



Stafylokoky

- ▶ G+ koky, nesporulující, nepohyblivé, často ve shlucích ve tvaru hroznů (lat. *staphyle* – hrozen).



- ▶ Velmi odolné proti vyschnutí, vyšší koncentraci solí (diagnostický znak).



Dělení stafylokoků

- ▶ Rozdělení podle koagulace plazmy na:
 - koaguláza pozitivní (*S. aureus*)
 - koaguláza negativní (CoNS – *S. epidermidis*)



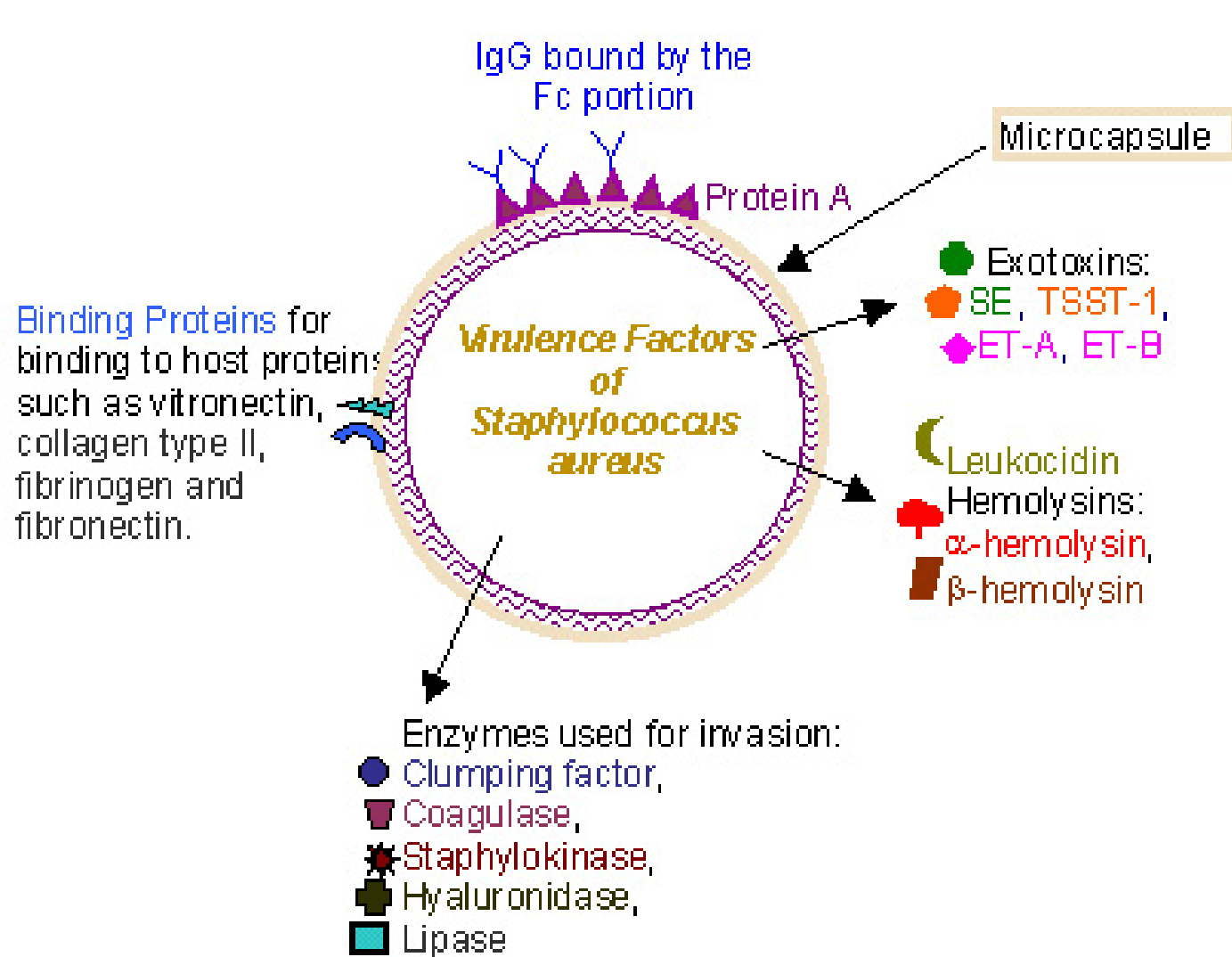
Staphylococcus aureus

(zlatý stafylokok)

- ▶ Jediný pro člověka běžně významný z tzv. **koaguláza pozitivních stafylokoků**.
- ▶ Původce infekcí kůže, chlupů, nehtů, otitis externa, zánětů spojivek, infekcí DCD (i HCD).
- ▶ Někdy také původce abscesů ve tkáních.
- ▶ Některé kmeny, vybavené určitými **nikoli běžnými** faktory virulence, způsobují závažné, ale vzácné choroby.
- ▶ Na druhou stranu mikroba nalezneme i na kůži zcela zdravých osob.



Faktorů virulence, nalézáných u *S. aureus*, je veliké množství...



...ale jen některé jsou přítomny u téměř 100 % kmenů; jiné jsou produkovány třeba jen jedním kmenem z tisíce!

Koaguláza negativní stafylokoky

- ▶ Koaguláza negativní stafylokoky (*Staphylococcus epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* a asi čtyřicet dalších druhů a poddruhů) jsou hlavní součástí běžné bakteriální mikroflóry kůže.
- ▶ Mohou být ale původci močových infekcí (hlavně *S. saprophyticus*), případně i infekcí ran, katéetrových sepsí aj.
- ▶ Jejich nález se tedy hodnotí jinak např. ve výtěru v nosu či ve stolici, jinak v moči, a zcela jinak v hemokultuře.



Staphylococcus epidermidis

- ▶ *Staphylococcus epidermidis*, nejběžnější z takzvaných koaguláza negativních stafylokoků.
- ▶ Je mnohem méně patogenní než *S. aureus*
- ▶ CoNS obecně: V poslední době jsou velice významnými původci infekcí u oslabených osob, zejména nemocničních.
- ▶ Na katétrech a jiných plastech často tvoří biofilm.



Klinický význam stafylokoků

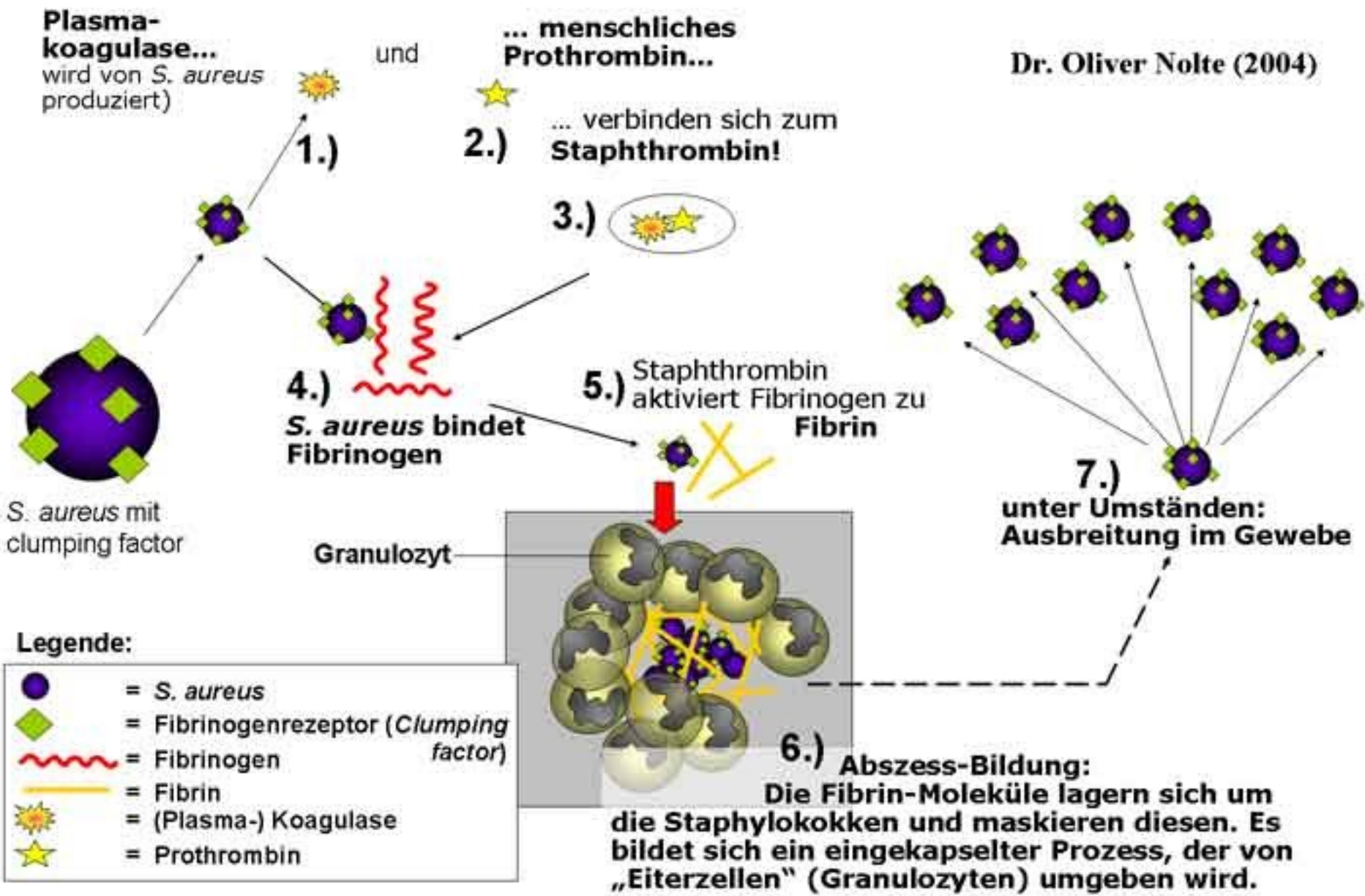
- ▶ Hnisavé infekce kůže
- ▶ Hnisavé infekce ran
- ▶ Hnisavé infekce měkkých tkání - abscesy
- ▶ Hnisavé infekce tvrdých tkání
- ▶ Sepse
- ▶ Infekce močových cest – *S. saprophyticus*
- ▶ Intoxikace - stafylokoková enterotoxikóza
 - syndrom toxického šoku (TSST-1)



Abscesy

- ▶ Na rozdíl od streptokoků, které vytvářejí ve tkáni zpravidla **neopouzdřené flegmóny**, tvoří stafylokoky spíše **opouzdřené abscesy**. Vznik abscesu (pomocí tzv. clumping faktoru a plasmakoagulázy – viz dále!) ukazuje následující schéma, převzaté z německých internetových stránek.





Příklady infekcí způsobených zlatým stafylokokem: Impetigo...



...bulózní impetigo...



<http://www.adhb.govt.nz/newborn/TeachingResources/Dermatology/BullousImpetigo/BullousImpetigo3.jpg>

...otitis externa s
furunklem...



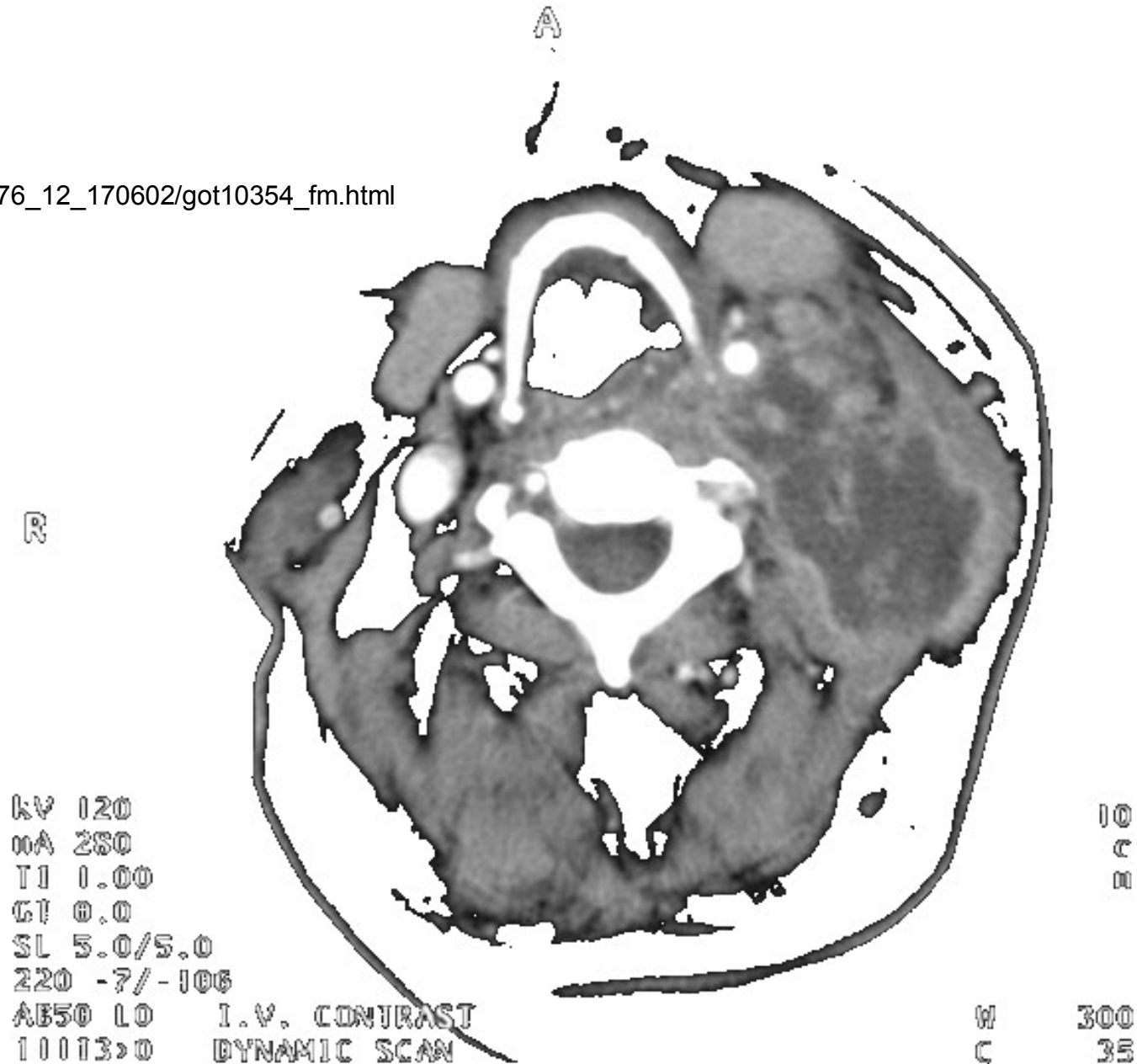
...či infekce kůže s krustami...

http://www.dermatology.co.uk/media/images/Infection_staphylococcus_crusting_chin_closeup.jpg



...ale také např. mozkové abscesy

http://www.mja.com.au/public/issues/176_12_170602/got10354_fm.html



Diagnostika

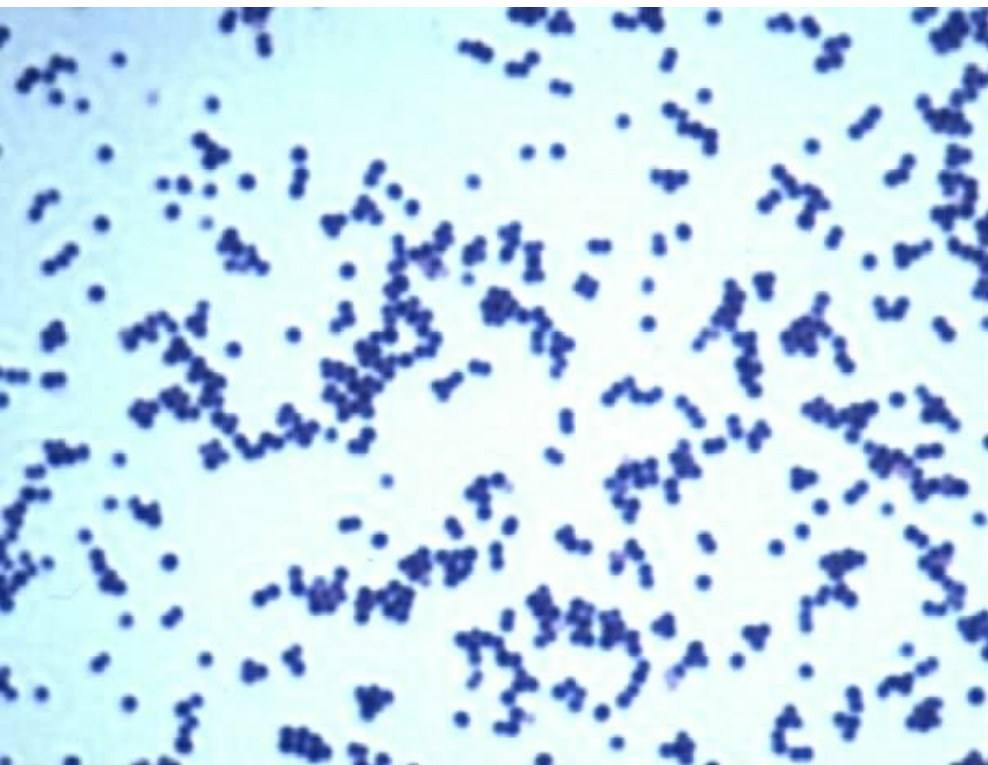
- ▶ Přímé metody jsou mikroskopie, kultivace, biochemické identifikační metody, průkaz antigenu, průkaz DNA, pokus na zvířeti apod.
- ▶ Přímé metody aplikujeme na vzorek (přímý průkaz ve vzorku) nebo na kmen (identifikace izolovaného kmene).
- ▶ Nepřímé metody jsou ty, kterými prokazujeme protilátky.



Diagnostika

- 1) Kultivace: na KA kolonie větší (2 mm), ploché, máslovité konzistence, bílé, anebo (hlavně u zlatého stafylokoka) nazlátlé
- 2) Mikroskopie: grampozitivní kok
- 3) Biochemické testy: kataláza pozitivní, oxidáza negativní, biochemicky lze rozlišit jednotlivé druhy
- 4) Testy na přítomnost koagulázy – *S. aureus* nebo CoNS
- 5) Komerčně dostupné testy – např. STAPHYtest 16





Autor: Prof. MVDr. Boris Skalka, DrSc.

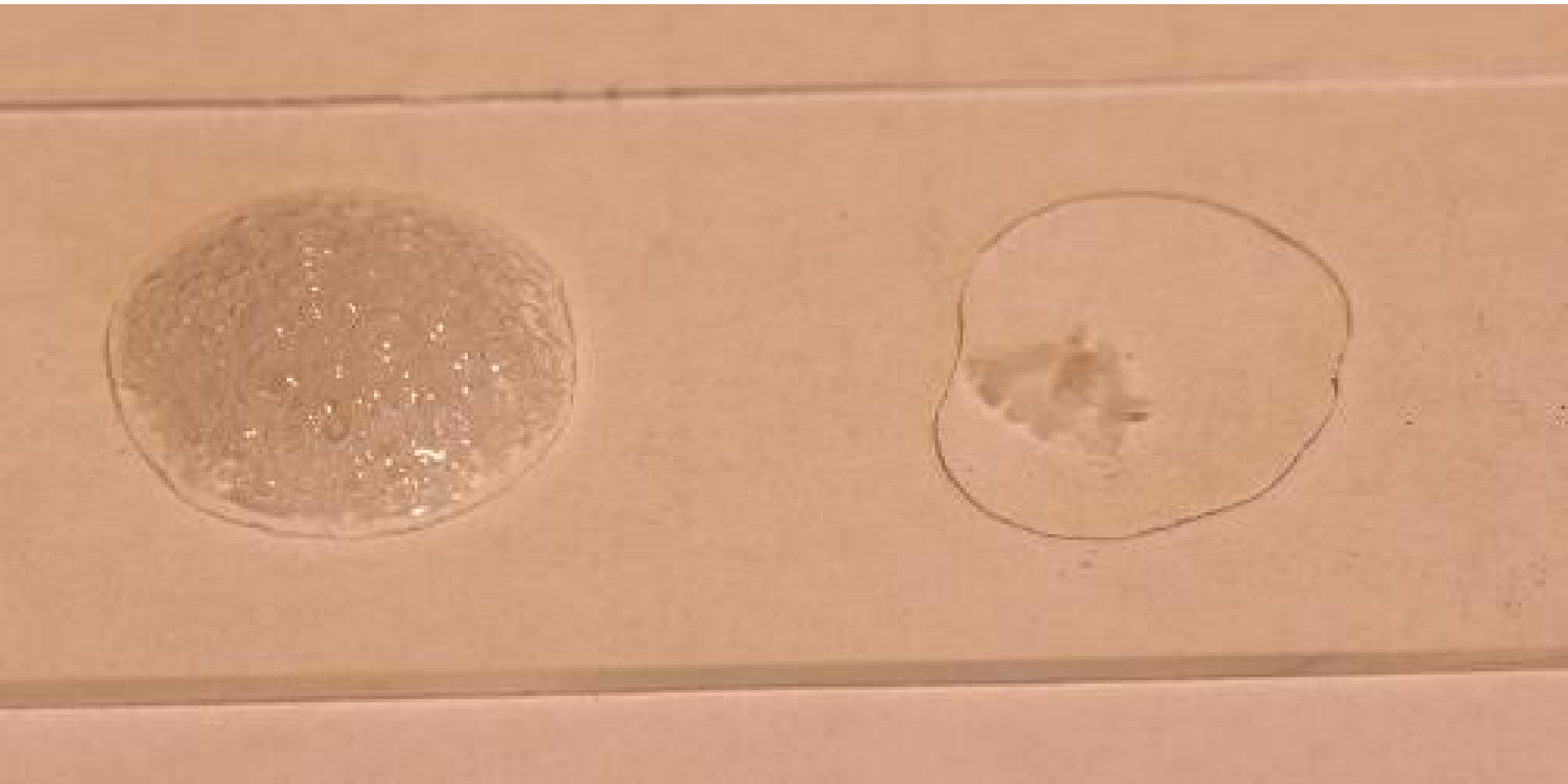


Diferenciální diagnostika 1

- ▶ Gramovo barvení – rozliší grampozitivní a gramnegativní koky / tyčinky.
- ▶ Pozitivní kataláza - odliší stafylokoky od streptokoků a enterokoků. Oxidázu bychom případně využili k odlišení mikokoků (v praxi výjimečně).
- ▶ Stejnou službu (a ve směsi mikrobů ještě lepší) udělá kultivace na KA s 10 % NaCl (6,5 % NaCl na kultivaci enterokoků).



Katalázový test (pro připomenutí) – H₂O₂



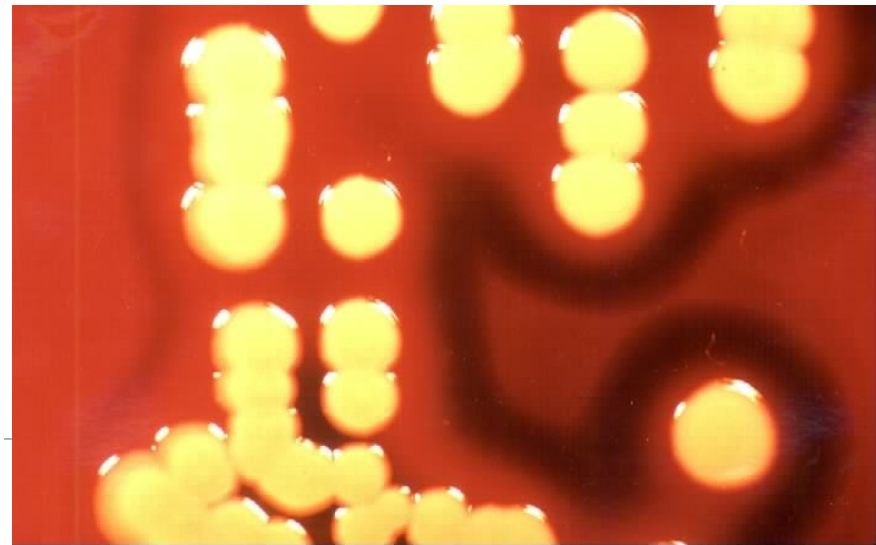
Diferenciální diagnostika 2

- ▶ **Plasmakoaguláza** je pozitivní u zlatého stafylokoka, negativní u koaguláza negativních. Konvertuje fibrinogen na fibrin (tvorba abscesů, typické shlukování buněk stafylokoků).
 - **Volná** – uvolňuje se do prostředí
 - **Vázaná (clumping factor)**
- ▶ Komerční testy na bázi antigenní analýzy jsou naopak velmi spolehlivé.
- ▶ **Hyaluronidáza** – hydrolyzuje kyselinu hyaluronovou, je nejen spolehlivá, ale i levná.

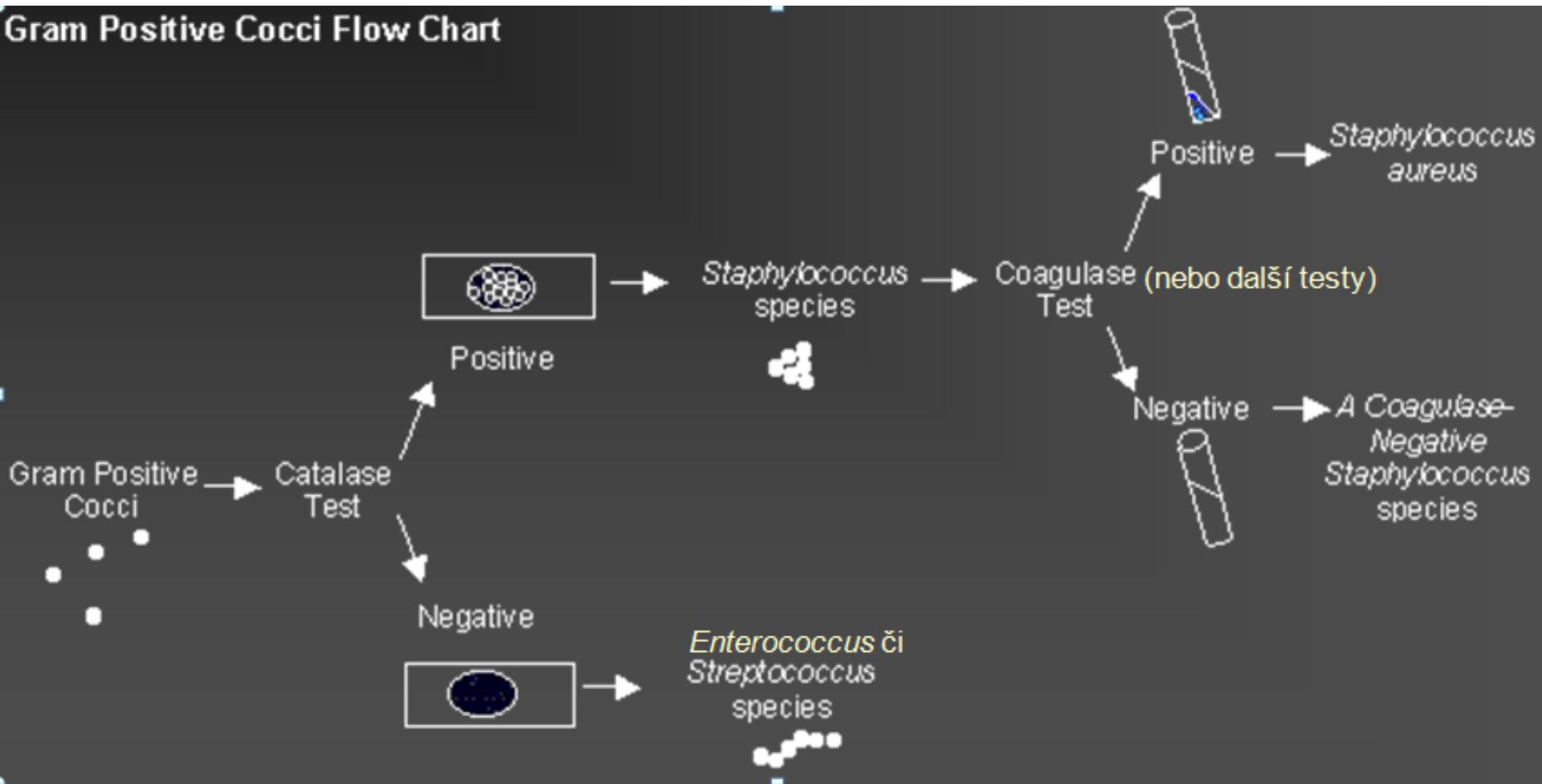


Méně spolehlivé testy

- ▶ Hemolýza: Koaguláza negativní stafylokoky mohou produkovat jen delta hemolyzin, zlaté i alfa a beta, mívají proto mnohem výraznější hemolýzu
- ▶ Nazlátlé zbarvení kolonií a jejich větší průměr může také napovědět.
- ▶ Větší shluky v mikroskopii jsou také typické pro zlaté stafylokoky.



Přehled diagnostiky (zjednodušeně)



Diagnostika CoNS

- ▶ Ve většině případů se spokojíme s tím, že jde o koaguláza negativního stafylokoka a netrváme na druhovém určení.
- ▶ Pokud na druhovém určení trváme (např. u hemokultur), lze je provést biochemicky.



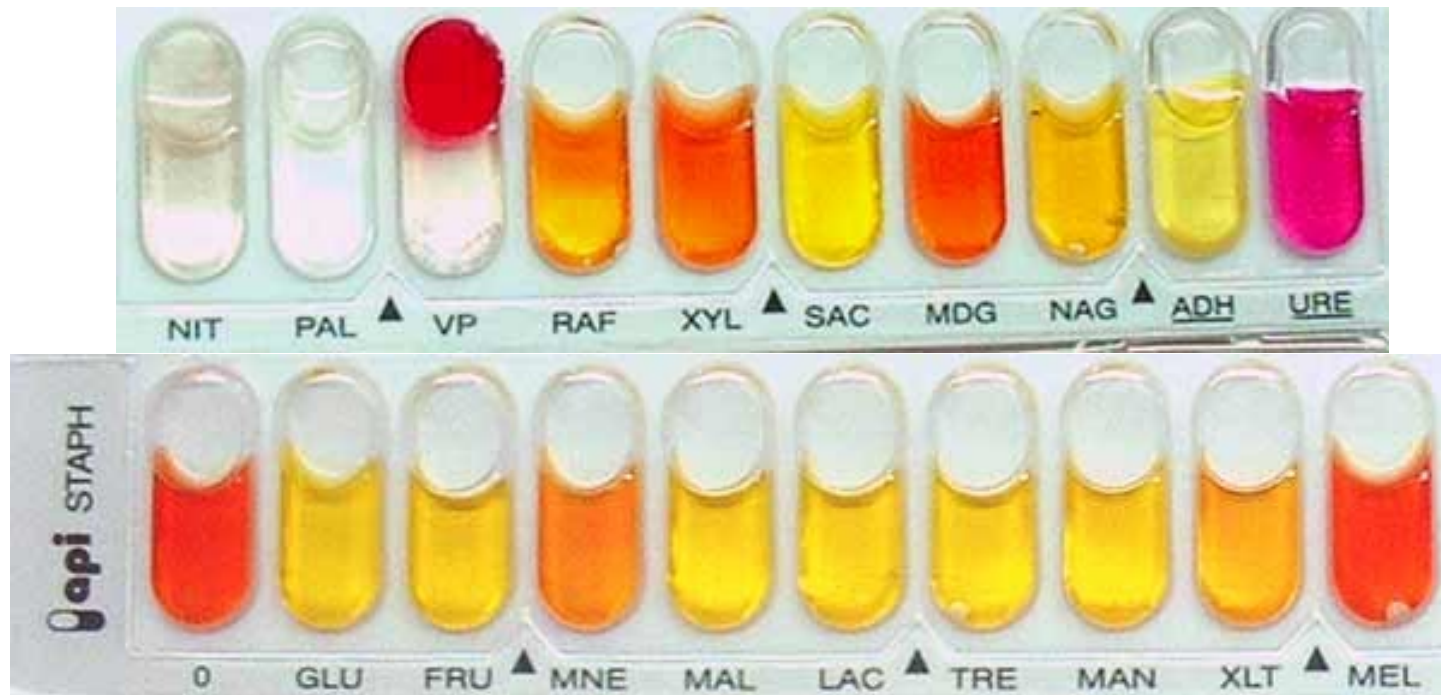
Api Staph – zahraniční obdoba našich STAPHYtestů 16

- ▶ V našich podmínkách se nejčastěji používá STAPHYtest 16 (Erba-Lachema). Bez ohledu na provenienci konkrétního testu zůstává princip stejný – kombinace většího počtu enzymatických reakcí, které se projeví změnou zbarvení reakčního důlku.



Jiná varianta testu API-Staph

- ▶ Na předchozím obrázku byl API-Staph pro automatické odečítání ve fotometru, tato varianta je pro „okometrické“ odečítání.



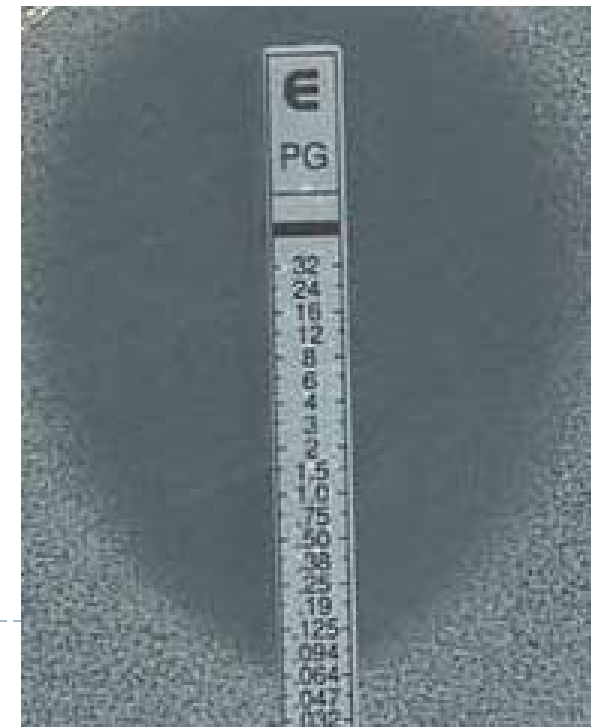
Antimikrobiální terapie - diagnostika

- ▶ Diagnostiku uzavírá testování citlivosti na antibiotika, zpravidla difusním diskovým testem.
- ▶ Konkrétní provedení může být různé.



Podle situace používáme buď
← kvalitativní, nebo
kvantitativní testy →

<http://www.microbes-edu.org>



Antimikrobiální terapie

- ▶ U stafylokoků je lékem volby **oxacilin**, u močových infekcí **cefalosporiny** první generace.
 - ▶ **Makrolidy** jsou na místě jen u alergických osob, **linkosamidy** mají význam u infekcí pohybové soustavy a **aminoglykosidy** raději jen v kombinaci.
 - ▶ **Glykopeptidová antibiotika** (vankomycin a teikoplanin) jsou v rezervě. Používají se u kmenů rezistentních na oxacilin, takzvaných **MRSA** a **MRSKN**. Pokud by byl stafylokok rezistentní i na ně, nebo pokud pacient toxické glykopeptidy nemůže užít, lze také použít linezolid a další nové látky.
-



MRSA a jejich detekce

- ▶ Methicilin rezistentní stafylokoky (MRSA) jsou epidemiologicky závažné kmeny, často způsobující nozokomiální infekce.
- ▶ Příčinou je změna tzv. penicillin binding proteins (PBP).
- ▶ Na problém upozorní malá zóna u oxacilinu. Ta však může být způsobena i jinými vlivy.
- ▶ Za průkazné se považuje, je-li malá zóna nejen u oxacilinu, ale i u cefoxitinu.



Přehled úkolů – diagnostika stafylokoků

- ▶ Mikroskopie VZORKU hemokultury – úkol 1
- ▶ Mikroskopie předložených KMENŮ – úkol 2

Po druhém úkolu poznáme grampozitivní koky.

- ▶ Popis kolonií na krevním agaru – úkol 3
- ▶ Růst na KA s 10 % NaCl – úkol 4
- ▶ Katalázový test – úkol 5

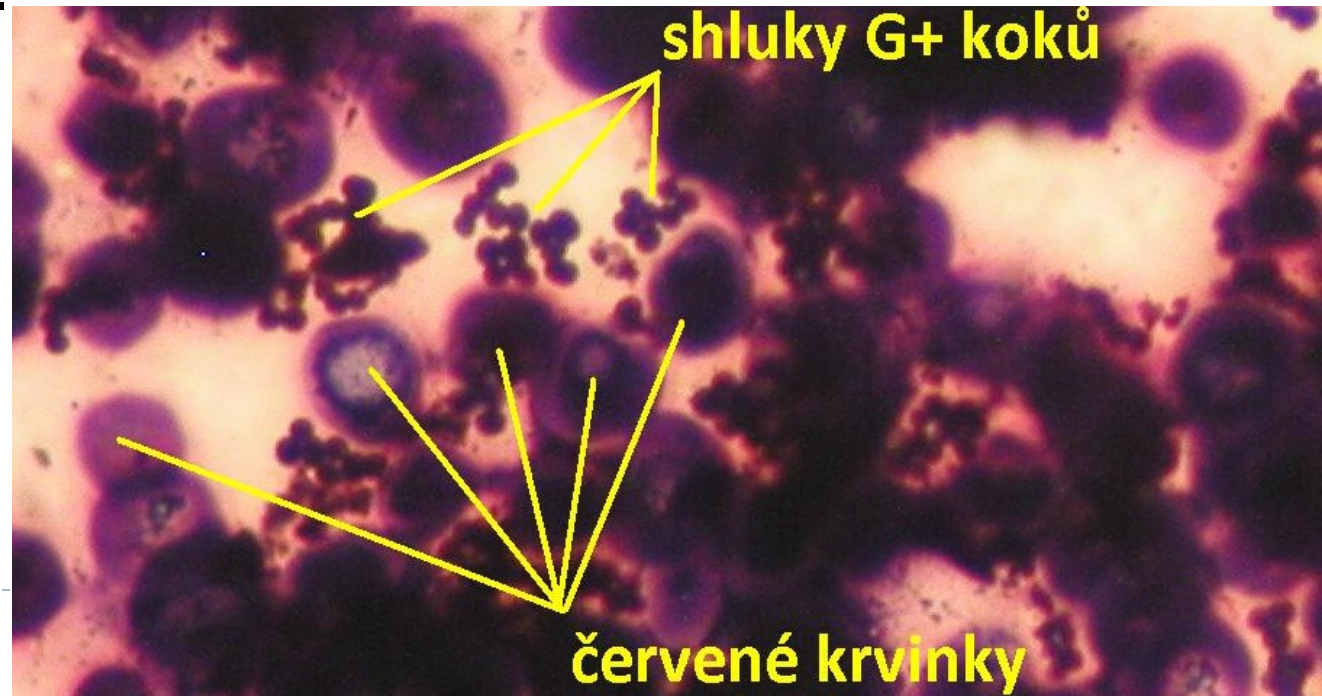
Po těchto úkolech odlišíme stafylokoky od ostatních.

- ▶ Odlišení zlatého stafylokoka od koaguláza negativních druhů – úkoly 6 a, b, c.
- ▶ Druhové určení stafylokoka – úkol 7
- ▶ Testování citlivosti na atb – úkol 8a, b



Úkol 1: Mikroskopie vzorku

- ▶ Prohlédněte si mikroskopický preparát hemokultury, obarvený podle Grama. (Nezapomeňte přikápnout imerzní olej! Použijte objektiv imerzní, 100×)
- ▶ Pátrejte po grampozitivních kocích ve shlucích, a také po erythrocytech.



Úkol 2: Barvení kultur podle Grama

- ▶ Obarvěte podle Grama čtyři podezřelé kmeny (pro zopakování: natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem, poté barvit: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní olej, imerzní objektiv zvětšující 100×).
- ▶ Jednoho podezřelého vyloučíte snadno: bude to G- tyčinka. Další tři podezřelí budou G+ koky a spolehlivě je tedy mikroskopií nedokážete rozlišit... Musíte postupovat dál



Úkol 3: Popis kolonií na KA

- ▶ Pečlivě si prohlédněte zbylé tři kmeny grampozitivních koků. Prohlédněte si i kmen gramnegativní tyčinky, všimněte si, jak moc se od koků její kolonie liší.
- ▶ Popište všechny vlastnosti kolonií a zvláště si všimněte těch vlastností, které odlišují stafylokoky od ostatních grampozitivních koků (výrazný pigment, konzistence).



Úkoly 4 a 5: Určení stafylokoka

- ▶ V úkolu 4 odhalíme stafylokoka tím, že roste na KA s 10 % NaCl, kdežto ostatní nikoli.
- ▶ V úkolu 5 odhalíme stafylokoka katalázovým testem (kolonie vmícháme do kapky peroxidu vodíku). Pokud šumí, je to stafylokok.



Úkoly 6a, b a c: Odlišení *S. aureus* od CoNS

- ▶ Úkol 6 a) – clumping factor neboli vázaná plasmakoaguláza (zůstává součástí těla mikroorganismu).
- ▶ Úkol 6 b) – volná (plasma)koaguláza (říká se jí „volná“, protože je to molekula enzymu, bakterií uvolňovaná do prostředí).
- ▶ *Komerční testy provádět nebudeme*
- ▶ Úkol 6 c) – hyaluronidáza (dekapsulace).



6 a): Clumping factor neboli také vázaná plasmakoaguláza – rychlé

- ▶ Kolonie se vmíchají do kapky králičí plasmy na podložním sklíčku.
- ▶ Pozitivita se projeví jako tvorba shluků v kapce plasmy (viz obrázek na další obrazovce).
- ▶ Nejde vlastně o KOAGULACI, ale o AGLUTINACI plasmy.
- ▶ Test není příliš spolehlivý.



Clumping-Factor positiv



<http://memiserf.medmikro.ruhr-uni-bochum.de>

Clumping-Factor negativ



6 b): Volná koaguláza – klasika

- ▶ Nejklasičtější z testů pro odlišení zlatého stafylokoka (koaguláza pozitivního stafylokoka).
- ▶ Kličkou nabrané kolonie vmícháme do králičí plasmy ve zkumavce.
- ▶ Pokud plasma koaguluje (má konzistenci želé), je kmen koaguláza pozitivní.



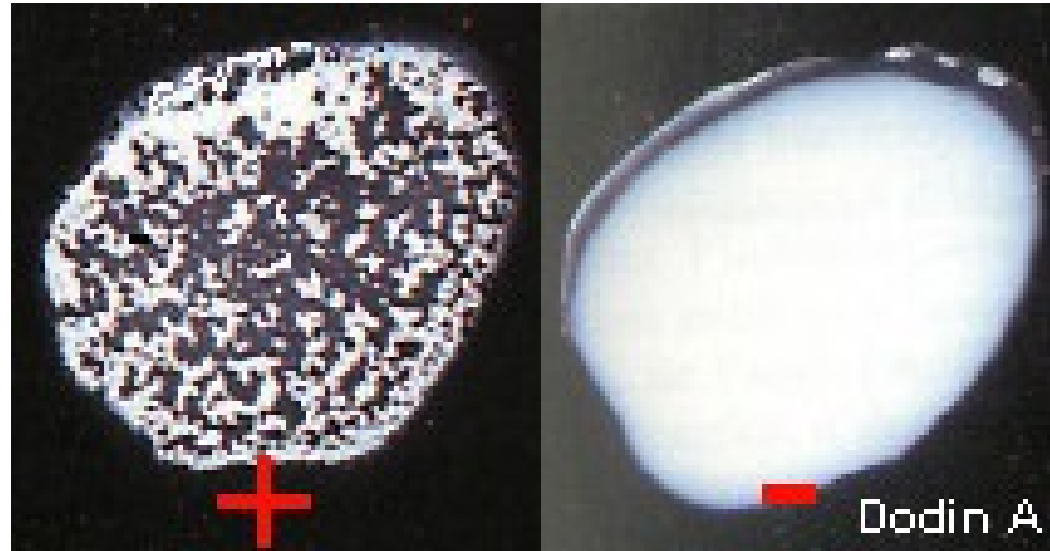
Dejte pozor, co nakreslíte do protokolu!

- ▶ Důležité je zakreslit, že negativní výsledek znamená, že ve zkumavce zůstává vodorovná hladina.
- ▶ Při pozitivním výsledku se tekutina buďto celá změní na konzistenci želé, nebo popř. je patrné „želé“ uvnitř tekutiny, viz obrázky.



Komerční testy, např. Staphaurex (v praxi je neprovádíme)

- ▶ Provedením připomínají clumping factor, ale jsou spolehlivější než volná plasmakoaguláza.
- ▶ Jsou bohužel poměrně drahé.



www.microbes-edu.org

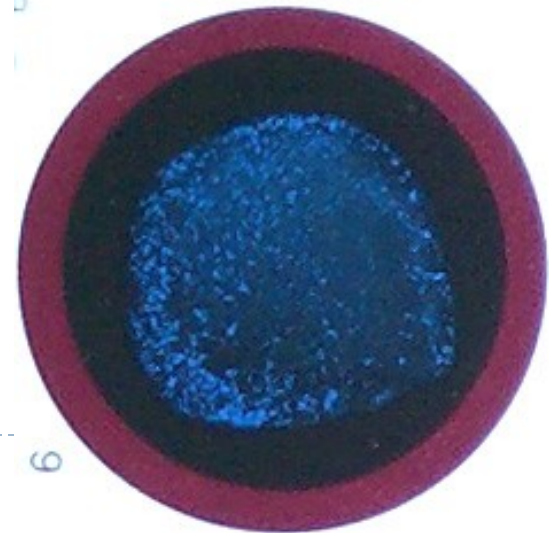
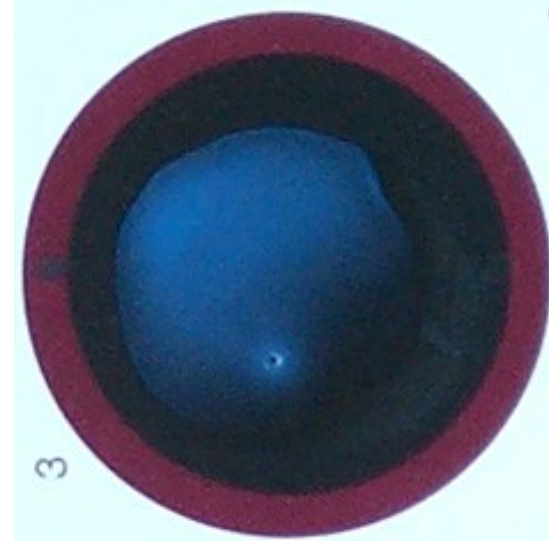


Souprava Staphaurex a výsledky

<http://www.pathologyinpractice.com>



www.microbes-edu.org

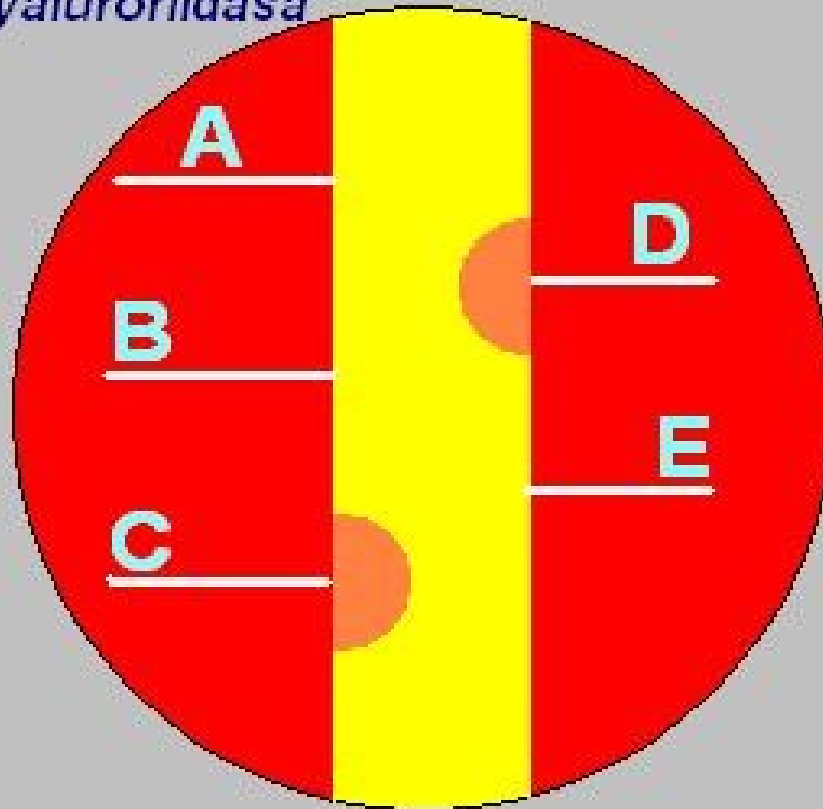


6c: Hyaluronidáza (test dekapsulace – „odpouzdrění“)

- ▶ Elegantní test, jehož principem je skutečnost, že hyaluronidáza, produkovaná zlatým stafylokokem (ne však koaguláza negativními stafylokoky) rozpouští pouzdro (kapsulu) opouzdrěných bakterií. Používá se druh streptokoka *Streptococcus equii*, pro člověka nepatogenní.
- ▶ Ztráta pouzdra se projeví změnou vzhledu streptokoka (ztráta „hlenovitosti“).



Hyaluronidasa



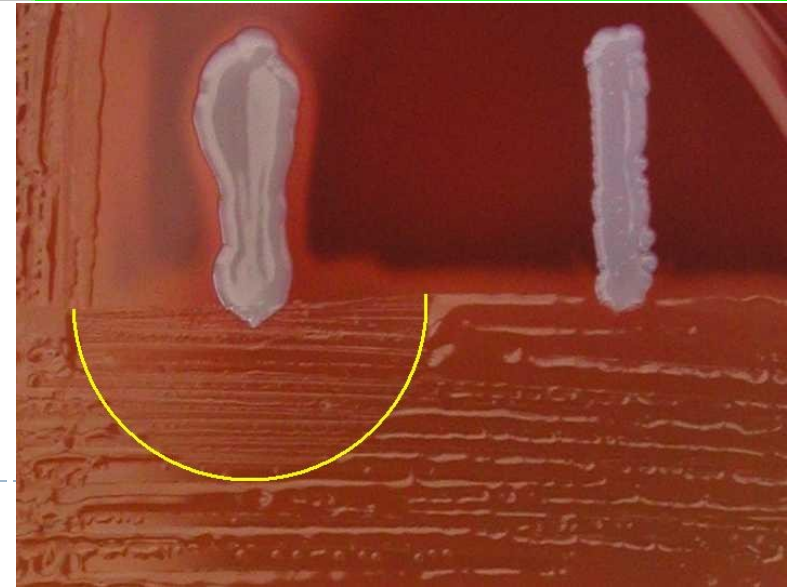
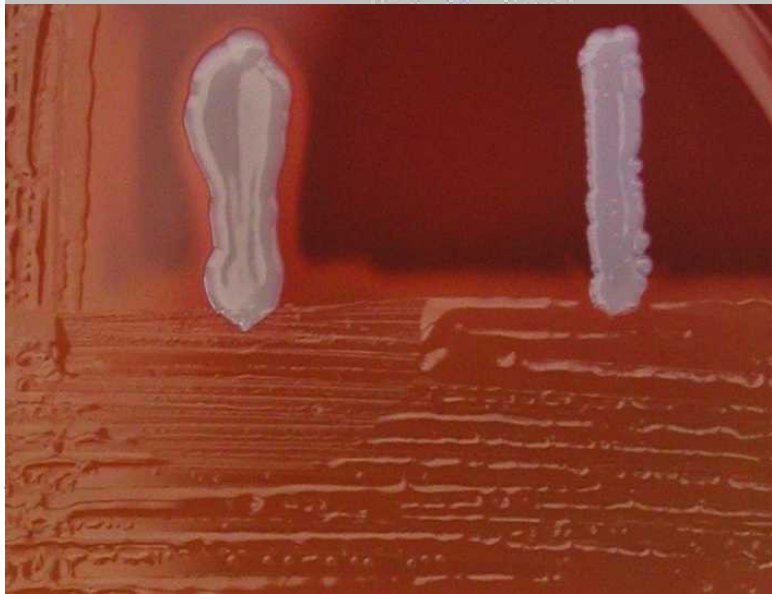
Žlutě "soplovitý" nárůst,
oranžově suché kolonie.

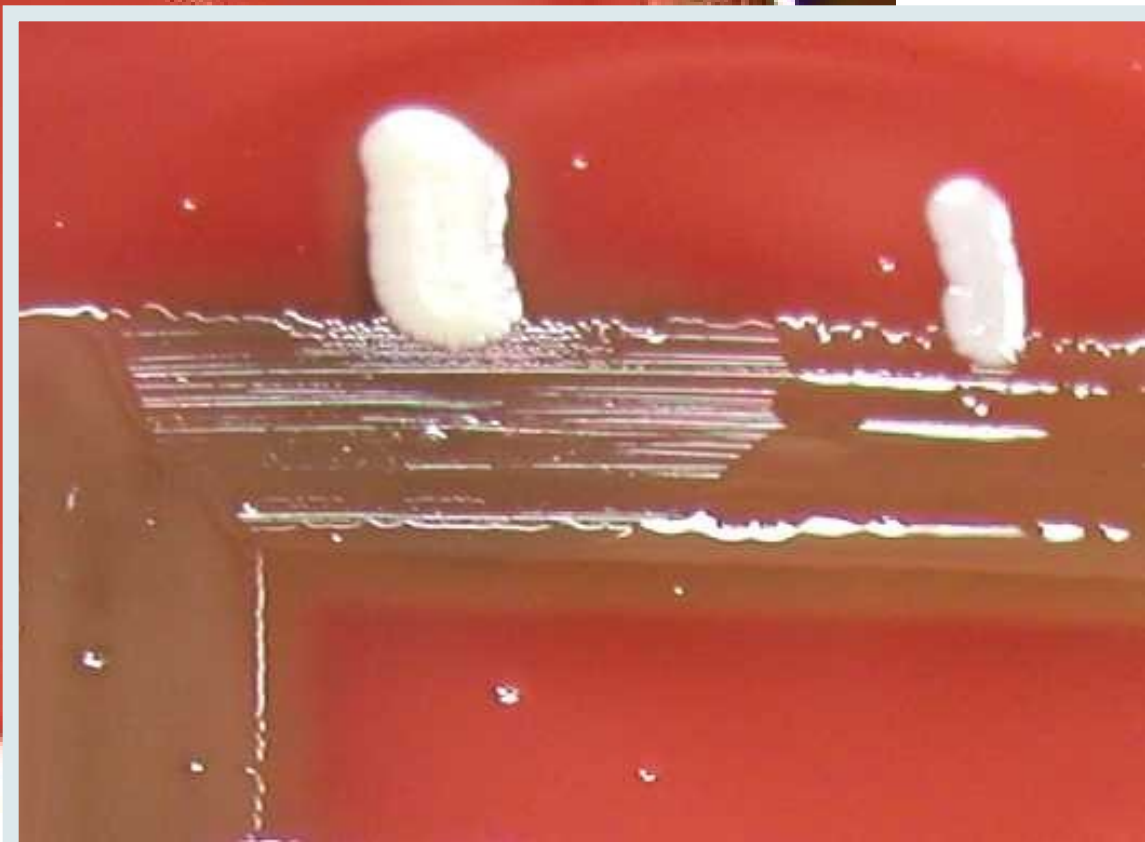
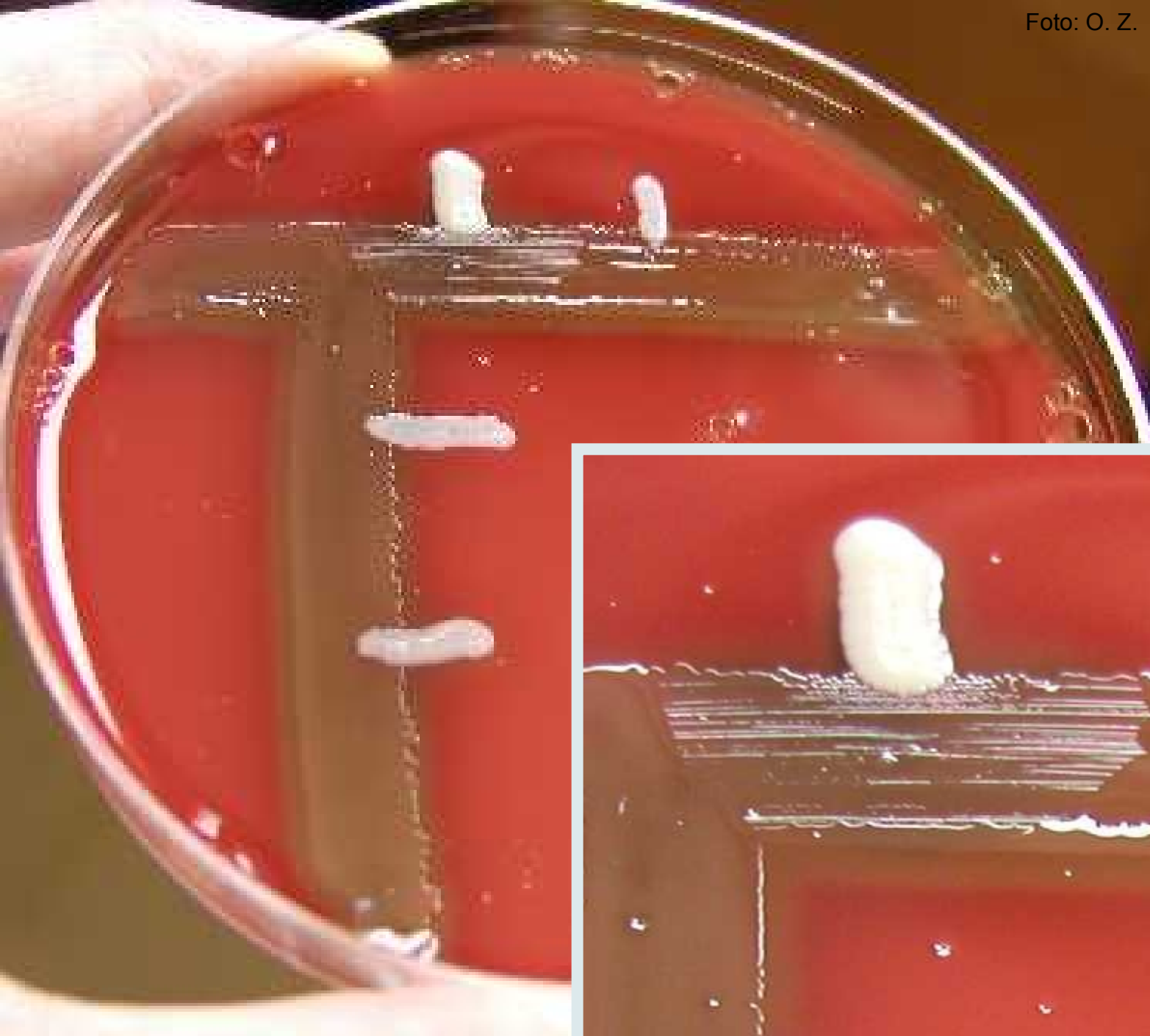
Bíle testované kmeny
stafylokoků.

Hodnocení:

Kmeny C, D patří k druhu
Staphylococcus aureus

Kmeny A, B, E patří mezi
koagulázanegativní
stafylokoky





Co tedy musíme prakticky provést

- ▶ V úkolu 6 a) provedete clumping faktorový test, když kolonie vmícháte do kapky plasmy.
- ▶ V úkolu 6 b) si prohlédneme výsledek testu plasmakoagulázy, který byl připraven včera. Odečítá se orientačně po 4 h a spolehlivě až po 24 h. Pozitivní je koagulovaná tekutina.
- ▶ V úkolu 6 c) si prohlédneme včera připravený hyaluronidázový test. Pozitivní je kmen, který „rozpouští slizovitost“ pásu streptokoka.



Úkol 7: rozlišení stafylokoků

- ▶ V úkolu 7 provedete STAPHYtest 16 podle návodu, čímž jednak ověříte identitu zlatého stafylokoka a jednak určíte toho druhého.
- ▶ Za normálních okolností zlaté stafylokoky STHAPHYtestem neurčujeme, stačí nám testy z úkolů 6a, b a c, popřípadě komerční testy.
- ▶ Test tedy slouží k diagnostice koaguláza negativních stafylokoků.



STAPHYtest 16 – jak ho odečíst

- ▶ Pozor – i když se jmenuje STAPHYtest 16, zahrnuje ve skutečnosti **17 reakcí**. Jako první se odečítá test VPT ve zkumavce. Červená tekutina ve zkumavce = pozitivní VPT, bezbarvá tekutina = negativní.
- ▶ První řádek STAPHYtestu = 2.–9. reakce
- ▶ Druhý řádek STAPHYtestu = 10.–17. reakce
- ▶ Vypočítejte kód a porovnejte s kódovníkem.
- ▶ Kód je šestimístný. Prvních pět číslic je ze trojic testů, šestá číslice je z dvojice.



Výsledek – první kmen

(703 651 = *S. aureus*, 99,8 %, $T_{in}=1,00$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Zkum	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
	Zkum	První řádek panelu								Druhý řádek panelu							
+																	
-																	
?																	
	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	7			0			3			6			5			1	

Výsledek – druhý kmen

(703 241 = *S. epidermidis*, 97,95 %, $T_{in}=1,00$)

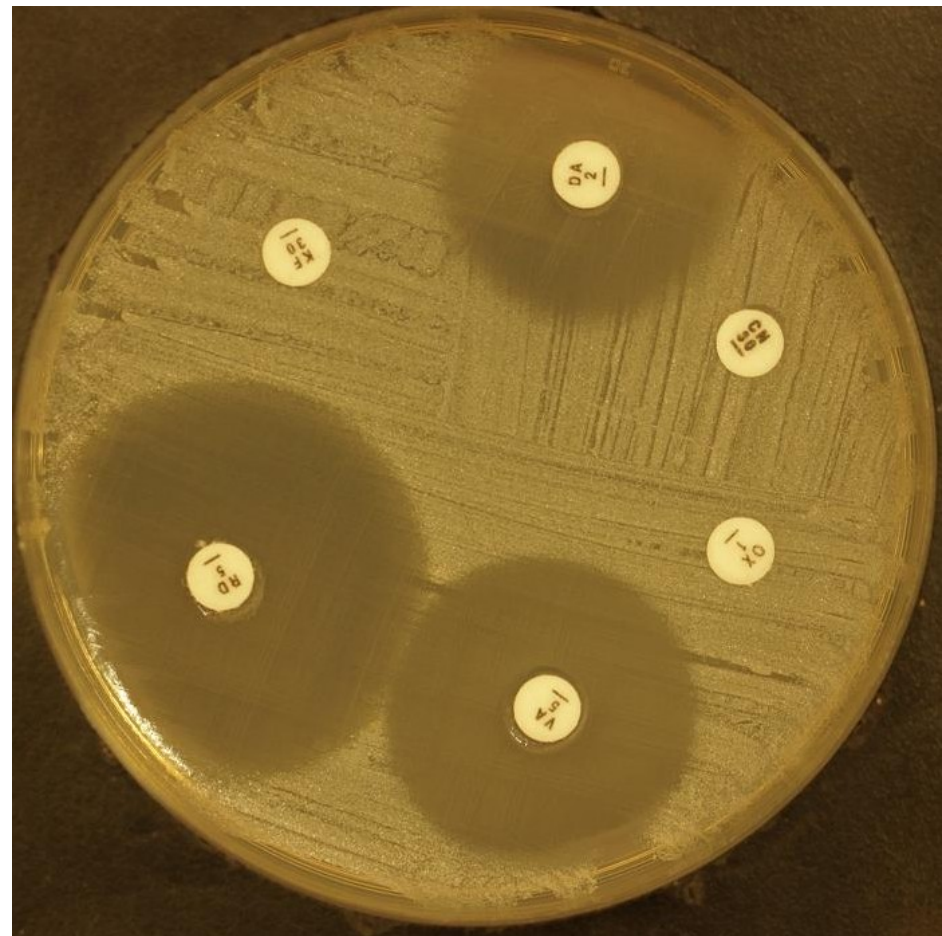
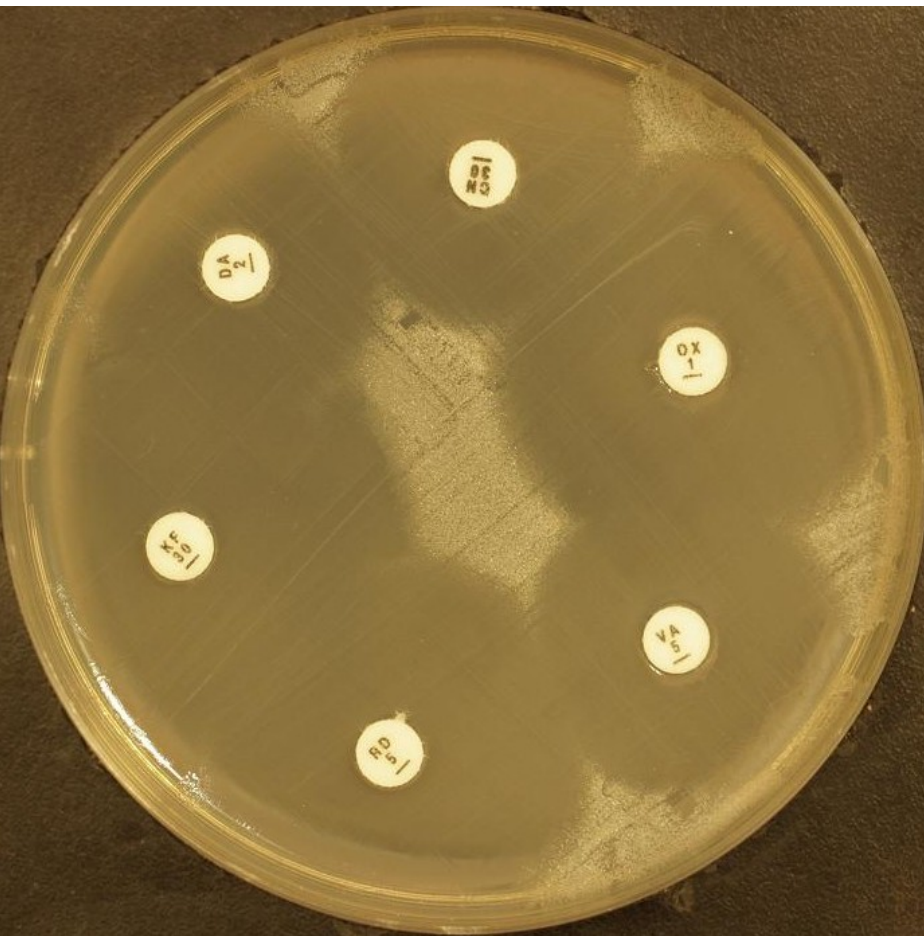
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Zkum	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
	Zkum	První řádek panelu								Druhý řádek panelu							
+																	
-																	
?																	
	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	7			0			3			2			4			1	

Úkol 8a: testy citlivosti

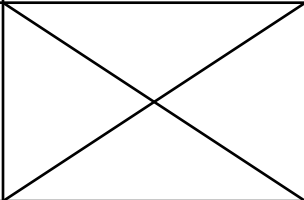
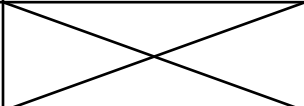
- ▶ Odečtete difusní diskový test – změřte zóny a porovnejte s referenčními zónami.
- ▶ Máte k dispozici šestici antibiotik (FOX = cefoxitin, DA = klindamycin, E = erythromycin, SXT = ko-trimoxazol, TE = tetracyklin, C = chloramfenikol; v praxi se používají dvě šestice, označované S1 a S2, my máme test S1).
- ▶ Každý set je proveden na kmen STKN (koaguláza negativního stafylokoka) a STAU (zlatého stafylokoka).



Test citlivosti u zlatého a koagulázanegativního stafylokoka



Zóny citlivosti některých běžných protistafylokokových antibiotik

Antibiotikum	Zkr.	„C“ je-li \geq než (mm)	„I“ je-li mezi (mm)	„R“ je-li $<$ než (mm)
Cefoxitin (cefalosporin); interpretace: oxacilin a další	CXT	\geq 22/25*		22/25* *
Erythromycin (macrolid)	E	\geq 21	18–20	$<$ 18
Clindamycin (linkosamid)	DA	\geq 22	19–21	$<$ 19
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	\geq 17	15–16	$<$ 15
Tetracyklin (tetracyklin)	TE	\geq 22	19–21	$<$ 19
Chloramphenikol	C	\geq 18		$<$ 18

*CXT: 22 mm *S. aureus*, 25 mm koagulázanegativní stafylokoky

Úkol 8b – vyhodnocení MRSA

- ▶ Máte několik kmenů na speciální screeningové půdě pro MRSA (opakování z jarního semestru).
- ▶ Modré kolonie jsou kolonie kmenů MRSA.
- ▶ Růžové či bílé kolonie jsou methicilin rezistentní kolonie jiných stafylokoků, než je *S. aureus*.
- ▶ Žádné kolonie znamenají, že jde o methicilin-citlivý kmen.



Úkol 2a: Nativní preparát

- ▶ Zhotovte nativní preparát a pozorujte pod zvětšením objektivem 40x (NE IMERZE!!!).
- ▶ Pozorujte, netřeba nic kreslit 😊



Úkol 3a: Mikrobiologické půdy

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
bujon	tekuté půdy	nažloutlá	pomno- žovací	aeroby
VL-bujon		tmavší		anaeroby
selenitový bujon		narůžovělá	selektivně pomnož.	salmonely
Sabourau- dův agar	pevné půdy ve zkumavce	bílá	selektivní*	houby
Löwentein- Jensen		zelená	obohacená	TBC
krevní agar	pevné půdy v misce	červená	obohacená diagnostická	většinu bakterií
Endova půda		růžová	selektivně diagnostická	především <u>enterobakterie</u>

Úkol 3a: Mikrobiologické půdy

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
MH	pevné půdy na Petriho miskách	skoro bílá	speciální	atb citlivost
NaCl		hnědá	selektivní	stafylokoky
VL-agar		červená	jako KA	anaeroby
XLD a blízký MAL		oranžová	selektivně diagnostická	salmonely
čokoládový agar		hnědá	obohacená	hemofily, neisserie
Levinthalův agar		nažloutlá	obohacená	hemofily
Slanetz- Bartley		růžová	selektivně diagnostická	enterokoky



Po tomto cvičení byste měli znát:

- ▶ Diagnostika rodu *Staphylococcus* (odlišení od streptokoků, enterokoků; odlišení *S. aureus* a CoNS)
- ▶ Funkci volné a vázané plasmakoagulázy a její využití v diagnostice
- ▶ Funkci hyaluronidázy a její využití v diagnostice
- ▶ Odečítání difúzních diskových testů a jejich interpretace
- ▶ Základní mikrobiologické půdy a jejich použití

