# Téma P01: Diagnostika stafylokoků

## K nastudování: Rod *Staphylococcus*. (z internetu, učebnic apod.)

## Z jarního semestru: Mikroskopie, Kultivace, Biochemická identifikace.

**Poznámka:** Všechny mikroskopické preparáty by měly být prohlíženy nejen na CX31, ale take na mikroskopu CX33 s kamerou a obrázek by měl být nasnímán, uložen do počítače a ukázán vyučujícímu jako důkaz, že jste úkol skutečně provedli. Na konci praktika musíte očistit mikroskop, vypnout ho a zakrýt, a rovněž odstranit uložené soubory z počítače (není-li řečeno jinak). Jakákoli manipulace s mikroskopy a počítači kromě toho, co je součástí úkolů nebo co provádíte na pokyn vyučujícího, je zakázána! Zejména je zakázáno jakékoli vkládání USB zařízení, což platí i pro učitelský počítač!

## Úkol 1:Mikroskopie infekčního materiálu

V mikroskopu sledujte preparát z hemokultury obarvený podle Grama. Popište a zakreslete sledované útvary.

*Hemokultura je vzorek krve, smíchaný s transportně-kultivačním médiem a zaslaný do laboratoře. Celá zaslaná lahvička se kultivuje v automatickém kultivátoru a v případě pozitivity se mimo jiné provádí mikroskopie; více o hemokulturách a hemokultivaci se dozvíte v praktiku P13.*

**Všímejte si přítomnosti bakterií (jejich tvaru, barvitelnosti a množství) dále také erytrocytů a dalších pozorovaných objektů. Nezapomeňte obrázek kreslit barevně a popsat vše, co vidíte. Pravidla z prvního jarního praktika stále platí!**

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

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kmen** | **K** | **L** | **M** | **N** |
| Gramovo barvení – Úkol 2 |  |  |  |  |
| Úkol 3: Kulti- vace (krevní agar)  | Velikost |  |  |  |  |
| Barva |  |  |  |  |
| Tvar |  |  |  |  |
| Profil |  |  |  |  |
| Hemo- lýza |  |  |  |  |
| 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 vneste je do kapky 3% H2O2 na podložním sklíčku. 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 býti stafylokokem, a JINÝ, pokud je to něco jiného.

## Úkol 6: Testy pro odlišení *S. aureus*

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

Na podložní sklíčko 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 plasmy ve zkumavce, tj. dojde k zrosolovatění 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 hyaluronidáza produkována, difunduje do okolí a do druhého dne způsobí lýzu pouzdra *Streptococcus equii.* To se projeví půlkruhovou zónou „ztráty slizovitosti“ v pásu naočkovaného *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: Bližší 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 odečtěte výsledky jednotlivých reakcí. Výsledky testů pro jednotlivé kmeny zapište a na základě interpretačních tabulek zjistěte, 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*Staphylococcus* \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | % pravděpod. | T index |
|  | VPT | 1H | 1G | 1F | 1E | 1D | 1C | 1B | 1A | 2H | 2G | 2F | 2E | 2D | 2C | 2B | 2A |
| **L** | + |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 |
| 7 |  |  |  |  |  |
| Kód: | Identifikace*Staphylococcus* \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | % pravděpod. | T index |

## Úkol 8a: Citlivost stafylokoků k antibiotikům

Zjistěte citlivost předložených kmenů stafylokoků k vybraným antibiotikům pomocí diskového difusního testu. Citlivost k předkládaným antibiotikům zhodnoťte na základě změření průměru inhibiční zóny a porovnání s tabulkou. Interpretujte kmeny jako citlivé (C), intermediární (I) či rezistentní (R) k daným antibiotikům.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Kmen 🡪 |  |  |
| Antibiotikum | Citlivý pokud je | Intermedi-ární pokud | Rezis-tentní | ∅ zóny (mm) | Interpre-tace | ∅ zóny (mm) | Interpre-tace |
| CefoxitinFOX\* | ≥ 22/25 mm\*\* |  | < 22/25 mm\*\* |  |  |  |  |
| ErythromycinE | ≥ 21 mm | 18–20 mm | < 18 mm |  |  |  |  |
| ClindamycinDA | ≥ 22 mm | 19–21 mm | < 19 mm |  |  |  |  |
| Ko-trimoxazolSXT | ≥ 17 mm | 15–16 mm | < 15 mm |  |  |  |  |
| Tetracyklin\*\*\*TE | ≥ 22 mm | 19–21 mm | < 19 mm |  |  |  |  |
| ChloramfenikolC | ≥ 18 mm |  | < 18 mm |  |  |  |  |

\*interpretuje se jako oxacilin, případně i další betalaktamy

\*\*22 mm platí pro *S. aureus,* 25 mm pro koagulázanegativní stafylokoky

\*\*\*výsledek platí také pro doxycyklin

***Důležitá poznámka:*** *V některých testech může být uprostřed sedmý disk MUP (mupirocin). Jde o lokálně podávanou antimikrobiální látku (obsaženou např. v preparátu BACTROBAN) sloužící například k alespoň dočasnému odstranění kmenů MRSA (viz dále) z nosní dutiny. Test citlivosti na mupirocin se provádí zejména při nálezech zlatých slafylokoků z nosu. Protože mupirocin nemají ve svých testech všichni, v praktiku ho nehodnotíme (jen pro informaci, kmen je citlivý při zóně ≥ 30 mm a rezistentní při zóně < 18 mm). – Důsledkem přítomnosti mupirocinu uprostřed je horší odečitatelnost ostatních zón. Pokud není možné změřit průměr, změřte poloměr (odhadněte střed disku) a vynásobte dvěma.*

## Úkol 8b: Demonstrace screeningové půdy na MRSA

U předložených kmenů (na bočním stole) ověřte, zda jde o MRSA. (Je možné, že půjde jen o jeden kmen, v tom případě chybějící řádky vynechejte.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Kmen | Kmen je | Staph only |
|  | MRSA – MRSKN – MS stafylokok\* |
|  | MRSA – MRSKN – MS stafylokok\* |
|  | MRSA – MRSKN – MS stafylokok\* |
| \*nehodící se škrtněte: MRSA = meticilin rezistentní *S. aureus*, MRSKN = meticilin rezistentní koagulázanegativní staf., MS = meticilin citlivý |