

Téma PZ01: 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 také 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 učitelův 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 pozitivy 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: 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 vnesete 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 být stafylokokem, a JINÝ, pokud je to něco jiného.

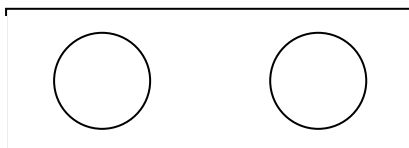
Úkol 6: Testy pro odlišení *S. aureus*

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)



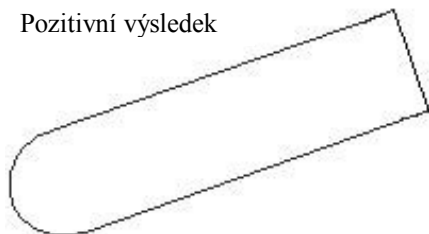
Kmen _____
(písmeno)

pozitivní – negativní
(škrtněte co neplatí)

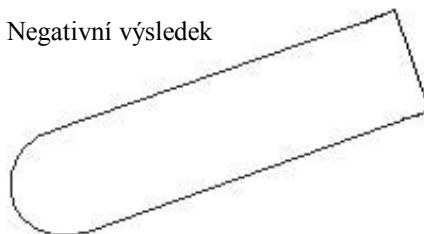
6b) Plasmakoagulázový test (test volné plasmakoagulázy)

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 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



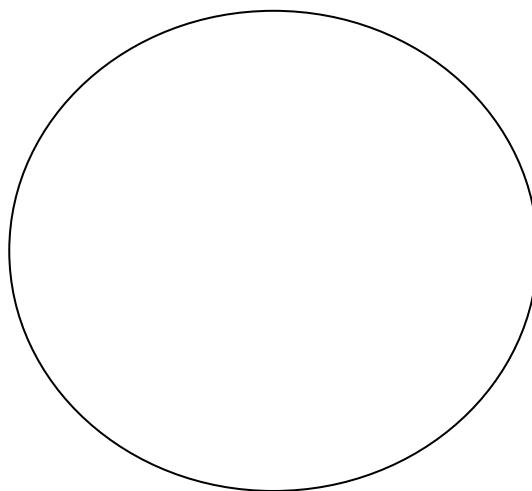
Negativní výsledek



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 hyaluronidáza 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: 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 se odečítají výsledky jednotlivých reakcí. Výsledky testů pro jednotlivé kmeny zapište a na základě interpretačních tabulek se zjistí o které druhy stafylokoků jde. Jakožto studenti zubního lékařství si v rámci tohoto úkolu pouze prohlédněte ukázkou vyplněného testu

	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			6			5			1	
	Kód: 703 651						Identifikace <i>Staphylococcus aureus</i>										

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	Intermediární pokud	Rezistentní	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace
Cefoxitin FOX*	≥ 22/25 mm**		< 22/25 mm**				
Erythromycin E	≥ 21 mm	18–20 mm	< 18 mm				
Clindamycin DA	≥ 22 mm	19–21 mm	< 19 mm				
Ko-trimoxazol SXT	≥ 17 mm	15–16 mm	< 15 mm				
Tetracyklin*** TE	≥ 22 mm	19–21 mm	< 19 mm				
Chloramfenikol C	≥ 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 nálezích zlatých stafylokoků 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

Studenti ZL neprovádějí

