



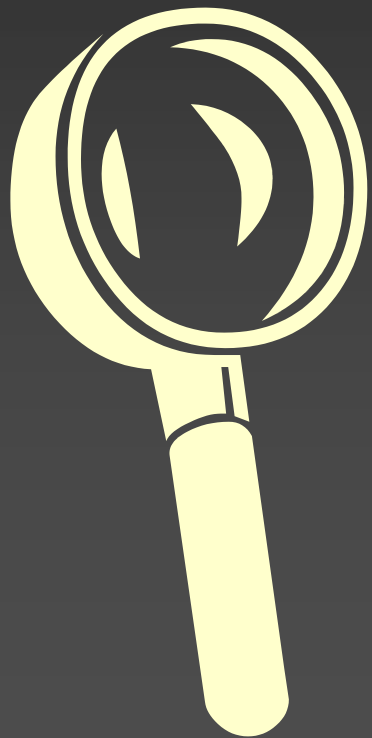
# Vítejte po prázdninách

opět na mikrobiologickém ústavu!

Mikrobiologický ústav uvádí

# NA STOPĚ PACHATELE

---



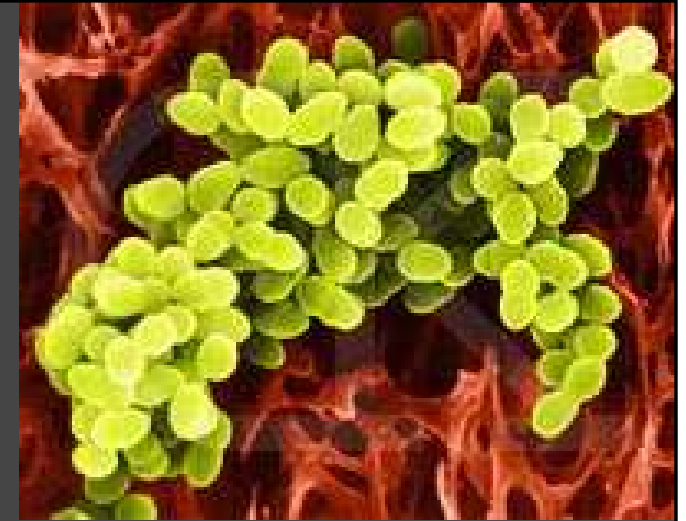
Díl první: Pachatelem je  
stafylokok

# Příběh první



- **Paní J. K.**, kuchařka ve studentské menze. Má na ruce **puchýř, naplněný žlutobílým hnisem**. Nevěnuje mu však pozornost. Bere do ruky knedlíky, které se už nevaří, ale jen prohřívají
- **Student Miloš** s přítelkyní si pochutnají na knedlíkách. Odpoledne mají schůzku ... ale co to? Půl hodinu před schůzkou Miloše najednou zničehož nic **rozbolelo břicho**. Na WC neví, který konec trávicí trubice nastavit vstříc míse dřív... Volá přítelkyni – ta má ale pochopení, je na tom stejně... Romantické odpoledne se nekoná...

# Kdo je vinen?



- Vinen je *Staphylococcus aureus* název z řeckého staphylé = hrozen
- Tento „zlatý stafylokok“ s oblibou způsobuje hnisavé infekce kůže a kožních adnex
- Některé kmeny produkují **enterotoxiny**, které fungují jako tzv. **superantigeny**
- Intoxikace bakteriálním toxinem se, na rozdíl od střevní infekce, projeví velice rychle; obvykle také rychle odezní

*Vinna je ovšem také kuchařka, která nedodržela pravidla hygieny a nevšímal si puchýře!*

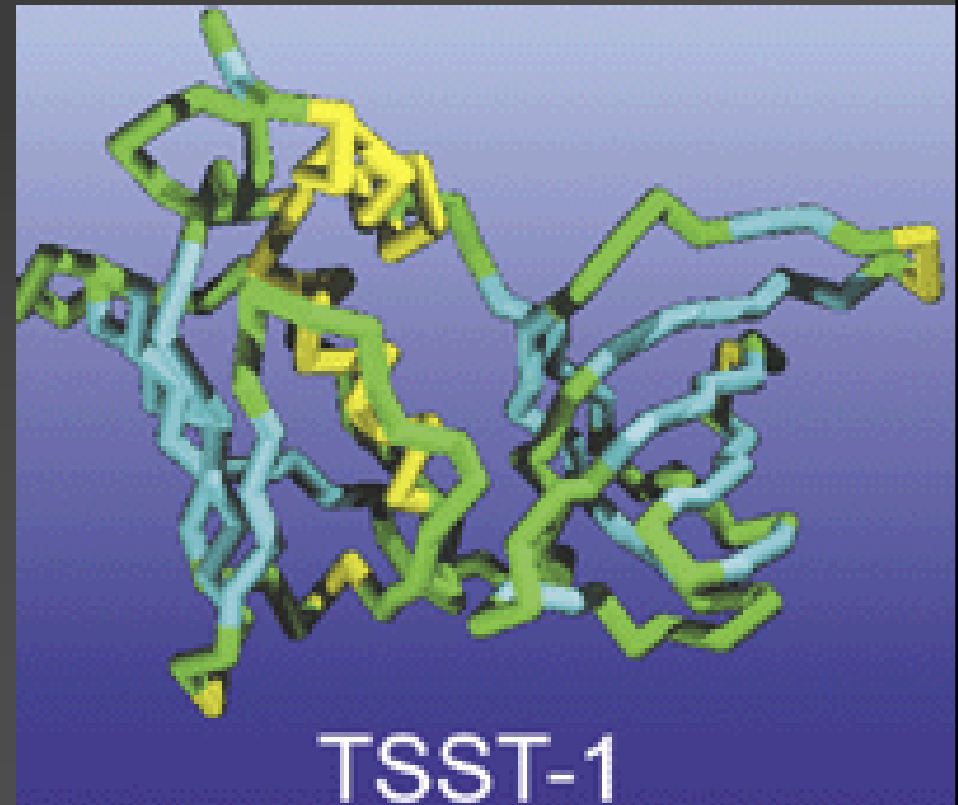
# Příběh druhý



- **Studentka P. Z.** je nervózní: opět na ni přišly „její dny“. Naštěstí má ty slevněné tampóny, které nedávno výhodně koupila.
- Najednou ji chytila **třesavka, mdloby, horečka**. Spolubydlička ji našla ležící na koberci a volá 155. Objevila se **vyrážka**, leží na JIP infekční kliniky...

# Kdo je vinen tentokrát?

- Opět je viníkem *Staphylococcus aureus*, tentokrát kmen produkující toxin zvaný **TSST-1** (toxin syndromu toxického šoku)
- Také tento toxin je **superantigenem**
- Způsobuje toxický šok, typicky se vyskytuje u **uživatelék menstruačních tampónů**



# Příběh třetí

- **Mladík F. B.** se zotavuje po těžké havárii. Do krevního řečiště má zavedeny dva žilní katétry pro infusní výživu a odběry krve
- Náhle se stav **prudce zhoršil**, objevily se vysoké horečky, které kolísají – ošetřující lékař vyslovil podezření na septický stav, odebírá krev na kultivaci (hemokulturu)
- Po **vyměnění katetru a antibiotické léčbě** se stav opět zlepšil

# A kdo je vinen nyní?

- Vinen je *Staphylococcus epidermidis*, nejběžnější z. takzvaných koaguláza negativních stafylokoků
- Koaguláza negativní stafylokoky patří do stejného rodu jako zlatý stafylokok
- Jsou mnohem méně patogenní než on
- V poslední době jsou však velice významnými původci infekcí u oslabených osob, zejména nemocničních

*Proč říkáme koaguláza negativním stafylokokům koaguláza negativní? Dozvíte se za chvíli...*



# Mohou být i hodné

- Ne každý stafylokok je ovšem zločincem!
- Koaguláza negativní stafylokoky jsou hlavní součástí běžné bakteriální mikroflóry na kůži.
- Dokonce ani nálezn **zlatého stafylokoka** na kůži či v nosní dutině nemusí znamenat přímo nemoc. Mnozí lidé jej mají trvale
- Leckdy je nálezn stafylokoka jen **náhodný**

# Jak vypátrat viníka?

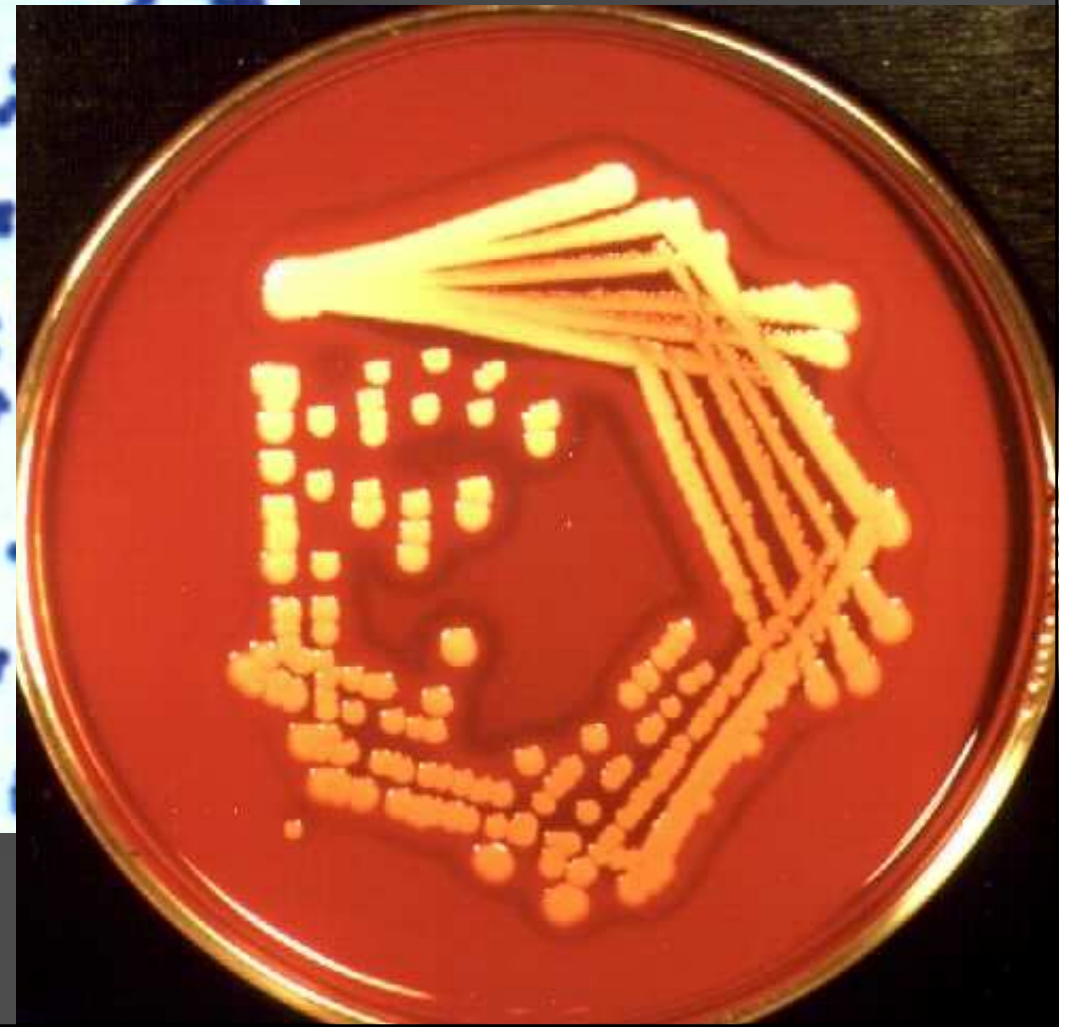


- Nejdříve si zopakujme kriminalistické **metody**, které jsme se naučili na jaře:
- **Přímé metody** jsou mikroskopie, kultivace, biochemické identifikační metody, průkaz antigenu, průkaz DNA, pokus na zvířeti apod.
- Přímé metody aplikujeme na **vzorek** (přímý průkaz ve vzorku) nebo na **kmen** (identifikace izolovaného kmene)
- **Nepřímé metody** jsou ty, kterými prokazujeme protilátky

# Popis pachatele (diagnostika)

- **Mikroskopie:** grampozitivní kok
- **Kultivace:** na KA kolonie větší (2 mm), ploché, máslovité konzistence, bílé, anebo (hlavně u zlatého stafylokoka) nazlátlé
- **Biochemické testy:** kataláza pozitivní, oxidáza negativní, biochemicky lze rozlišit jednotlivé druhy
- **Antigenní analýza a speciální testy** mohou při pátrání velice pomoci

# Fotografie z databáze zločinců



# Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika 1)

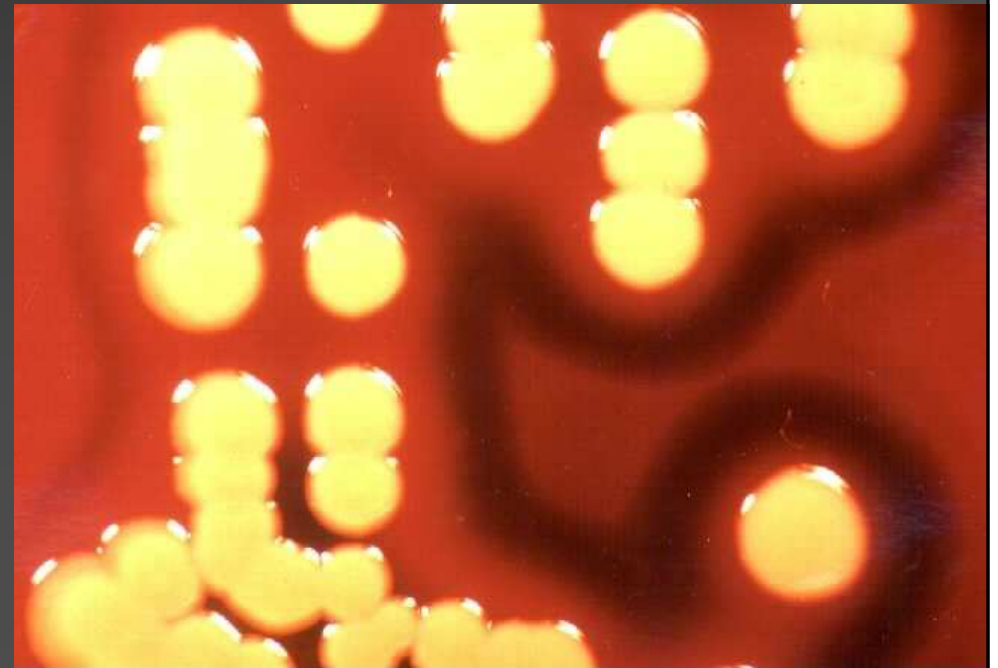
- **Gramovo barvení** odhalí všechny bakterie, které nepatří mezi **grampozitivní koky**
- **Pozitivní kataláza** odliší stafylokoky od streptokoků a enterokoků
- Stejnou službu (a ve směsi mikrobů ještě lepší) udělá **kultivace na KA s 10 % NaCl**
- *Orientačně můžeme využít i toho, že kolonie ostatních G+ koků nejsou bílé či nazláté a že mikroskopicky netvoří shluky*

# Rozlišení podezřelých stafylokoků (diferenciální diagnostika 2)

- **Volná plasmakoaguláza** je pozitivní u zlatého stafylokoka, negativní u koaguláza negativních, proto se tak také jmenují
- **Clumping factor neboli vázaná plasmakoaguláza** se používá stejně, ale je méně spolehlivá
- **Komerční testy** na bázi antigenní analýzy jsou naopak velmi spolehlivé
- **Hyaluronidáza** je nejen spolehlivá, ale i levná

# Méně spolehlivé testy: hodí se při pátrání, ale nejsou důkazem pro soud!

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



# Obávaný „zlatý“ to není: a co teď?

- 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**
- V našich podmínkách se nejčastěji používá **STAPHYtest 16** (Pliva-Lachema)

## Na závěr – čím pachatele potrestat

- Diagnostiku uzavírá testování citlivosti na antibiotika, zpravidla difusním diskovým testem
- Samozřejmě se týká jen „pachatelů“ (patogenů)



# A nyní se pustíme do pátrání!

## Přehled úkolů, které nás čekají:

- Mikroskopie VZORKU sputa – úkol 1
- Mikroskopie předložených KMENŮ – úkol 2

Po druhém úkolu poznáme grampozitivní koky

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

Po těchto úkolech odlišíme stafylokoky od ostatních

- Odlišení zlatého stafylokoka od koaguláza negativních druhů – úkoly 6a, 6b a 8
- Druhové určení stafylokoka – úkol 7
- Testování citlivosti na atb – úkol 9

# Úkol 1: Pátráme po pachateli mikroskopicky ve vzorku

- Prohlédněte si mikroskopický preparát sputa, obarvený podle Grama
- Pátrejte po **grampozitivních kocích** ve shlucích a také po **leukocytech** (hlavně polymorfonukleárech), které svědčí pro bakteriální zánět



# Úkol 2: Defilé podezřelých (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 obj.)
- **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: Shromáždění otisků prstů – 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: dopadení 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

*Pozor! Kdybychom přeskočili předchozí kroky, udělali bychom špatně. Pozitivní katalázu má spousta bakterií. Relativně průkazná je jen tehdy, víme-li, že náš kmen je G+ kok*

# Je to stafylokok. Ale který?

## Úkoly 6a, 6b a 8: odlišení „zlatého“

- **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, enzymem uvolňovaná do prostředí)
- *Komerční testy provádět nebudeme*
- **Úkol 8** – hyaluronidáza (dekapsulace)

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

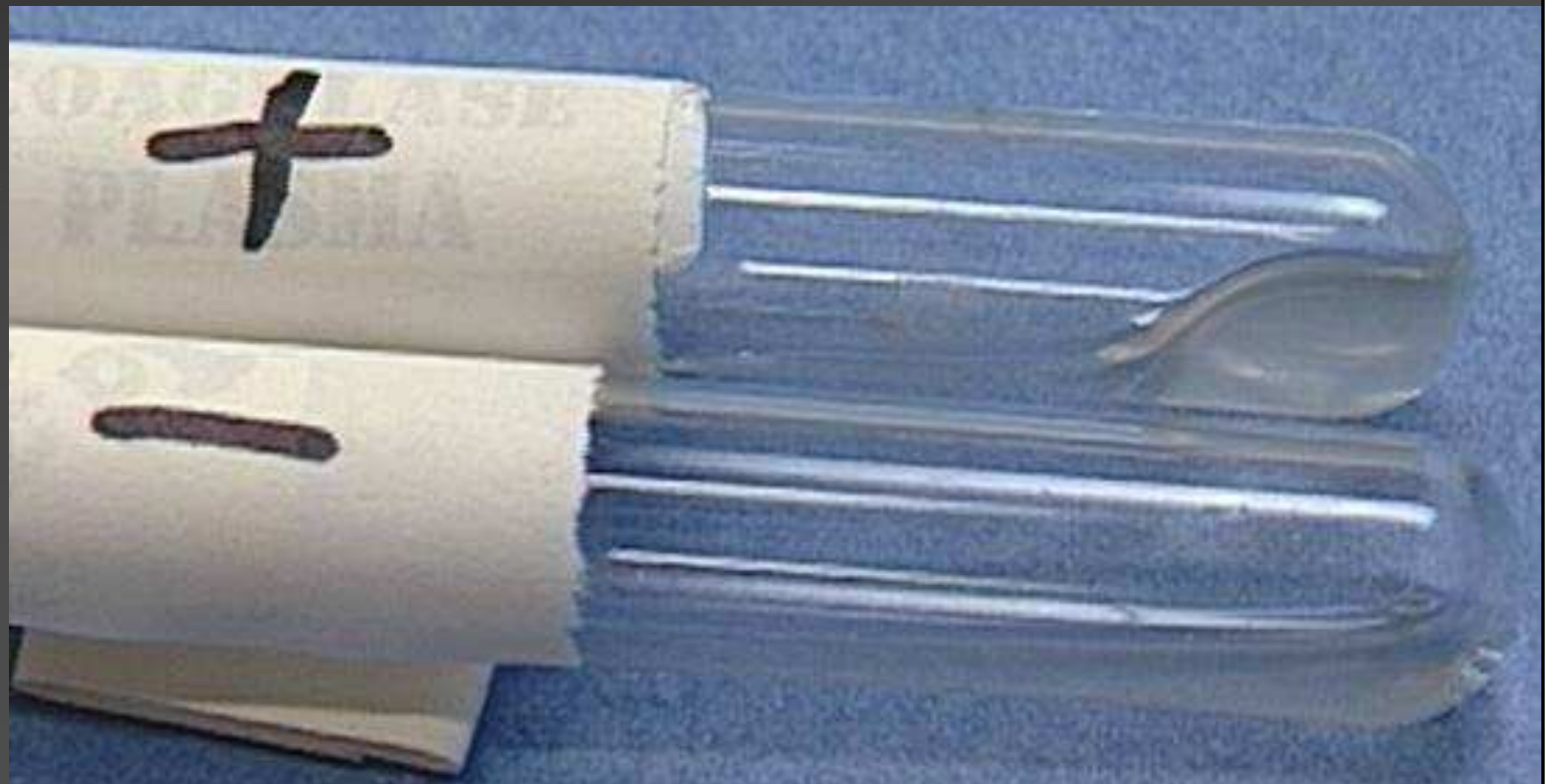
- Kolonie se vmíchají do kapky králičí plasmy na podložním sklíčku
- Nejde vlastně o KOAGULACI, ale o AGLUTINACI plasmy
- Test není příliš spolehlivý



## 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 zkoaguluje (má konzistenci želé), je koaguláza pozitivní

Existují i jiné koaguláza + stafylokoky než *S. aureus*, pro člověka však nemají význam.





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

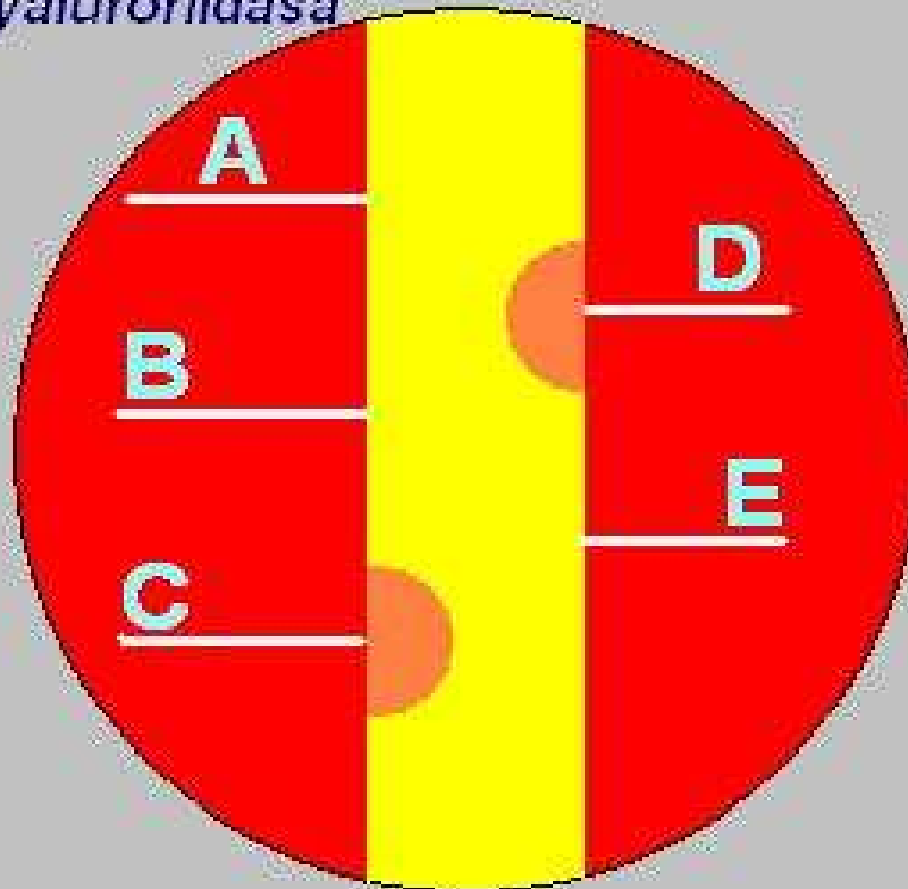
- Provedením připomínají clumping factor, ale jsou spolehlivější než volná plasmakoaguláza
- Jsou bohužel poměrně drahé



# 8: Hyaluronidáza (test dekapsulace) (Úkol 7 zatím přeskočíme)

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

## Hyaluronidasa



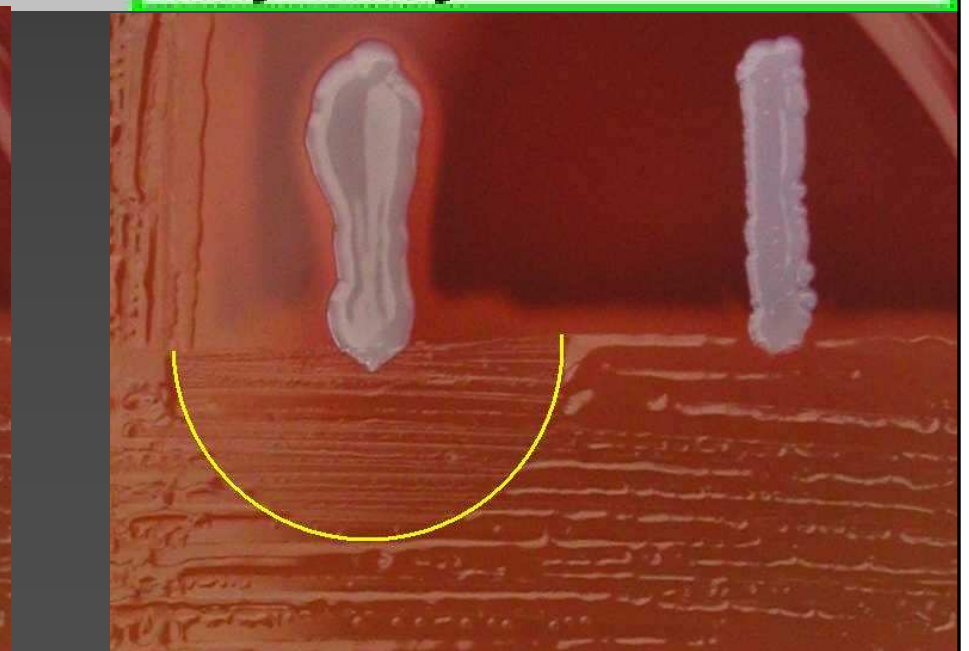
Žlutě "soplovitý" nárůst,  
oranžově suché kolonie.

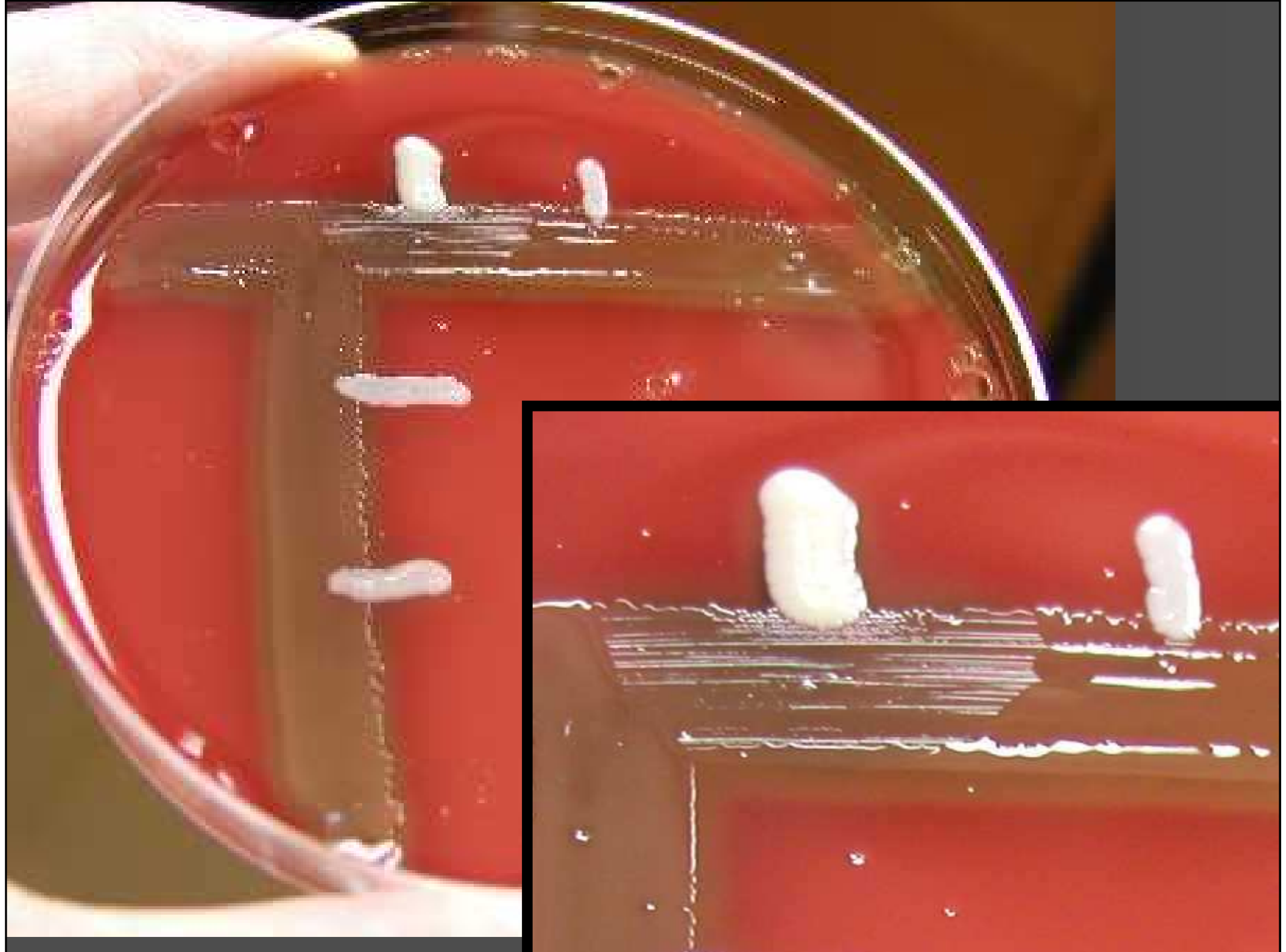
Bíle testované kmeny  
stafylokoků.

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 8 si prohlédneme včera připravený hyaluronidasový test. Pozitivní je kmen, který „rozpouští slizovitost“ pásu stafylokoka

# 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, 6b a 8, popřípadě komerční testy
- Test tedy slouží k diagnostice koaguláza negativních stafylokoků




















































Vám se ovšem žíly jistě nezkrátí, když si ověříte tímto testem i identifikaci zlatého stafylokoka

# 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 = neg.
- První řádek STAPHYtestu = 2. – 9. reakce
- Druhý řádek STAPHYtestu = 10. – 17. rce
- 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
		První řádek panelu								Druhý řádek panelu							
+																	
-																	
?																	
	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
	1	2	4	<del>1</del>	<del>2</del>	<del>4</del>	1	2	<del>4</del>	<del>1</del>	2	4	1	<del>2</del>	4	1	<del>2</del>
		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
		První řádek panelu								Druhý řádek panelu							
+																	
-																	
?																	
	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
	1	2	4	<del>1</del>	<del>2</del>	<del>4</del>	1	2	<del>4</del>	<del>1</del>	2	<del>4</del>	<del>1</del>	<del>2</del>	4	1	<del>2</del>
		7		0			3			2			4		1		

# Api Staph – zahraniční obdoba našich STAPHYtestů 16

- Bez ohledu na provenienci konkrétního testu zůstává princip stejný – kombinace většího počtu enzymatických reakcí, které se projeví změnou zbarvení reakčního důlku



# Léčba: spravedlivý trest zločinci

- Zločinné stafylokoky potrestáme vhodným antibiotikem. U stafylokoků je lékem volby oxacilin, u močových infekcí cefalosporiny první generace. Oblíbené 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

# Obvyklé pravidlo:

## horší patogen – lepší citlivost

- Při plnění devátého úkolu si možná všimnete, že horší patogen (zlatý stafylokok) je zpravidla citlivější než mírnější patogen (koaguláza negativní stafylokok). Toto pravidlo je logické: menší patogenita je znakem adaptace, schopnosti mikroba koexistovat s námi a nevyvolávat u člověka chorobný stav. → přivyknutí mimo jiné i antibiotikům, která používáme.
- **Neplatí ovšem vždycky!** Jsou výborně citlivé kmeny *S. epidermidis*, a jsou kmeny MRSA.

# MRSA a jejich detekce

- Meticilin rezistentní stafylokoky (MRSA) jsou epidemiologicky závažné kmeny, často způsobující nozokomiální infekce
- Příčinou je změna tzv. **penicilin 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**

# Úkol 9: účinnost uloženého trestu (V protokolu chyba tisku – „úkol 8“)

- Odečtete **difusní diskový test** – změřte zóny a porovnejte s referenčními zónami
- Máte k dispozici DVA sety: S1 (základní set) a S2 (rozšířený)
- Každý set je proveden na kmen STKN (koaguláza negativního stafylokoka) a STAU (zlatého stafylokoka).
- Na set S2 nemáte v protokolu tabulku – pište prosím z druhé strany listu

# Prosíme, neopisujte!

- Každý půstůl (označeno A až H) má jiné kmeny *S. epidermidis* (STKN) a *S. aureus* (STAU), proto každému vyjde jiná citlivost. Správné citlivosti pro každý půstůl máme napsané. Při kontrole protokolů budou uznány pouze výsledky odpovídající vašemu půstolu
- Dva půstoly mají STAU = MRSA – v tom případě neplatí pravidlo, že koaguláza negativní stafylokok by měl být citlivější.

# Odečtení testu citlivosti: S1 (základní test)

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Oxacilin (protistaf. penic.)	OX	13/18 mm
Cefalotin (cefalosp. 1. g.)	KF	18 mm
Erytromycin (makrolid)	E	23 mm
Klindamycin (linkosamid)	DA	21 mm
Co-trimoxazol (směs 2)	SXT	16 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	15 mm
Cefoxitin (k průk. MRSA)	FOX	20/25 mm

OX: 13 mm *S. aureus*, 18 mm koaguláza negativní stafylokok

FOX: 20 mm *S. aureus*, 25 mm koaguláza negativní stafylokok



# Odečtení testu citlivosti: S2 (rozšířený test)

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Cefuroxim (CS 2. gen.)	CXM	20/23 mm
Chloramfenikol	C	18 mm
Gentamicin (aminoglyk.)	CN	15 mm
Vankomycin (glykopeptid)	VA	12 mm
Teikoplanin (glykopeptid)	TEC	14 mm
Rifampicin (rifamycin)	RD	20 mm

CXM: 20 mm *S. aureus*, 23 mm koaguláza negativní stafylokoky

# Ilustrační foto

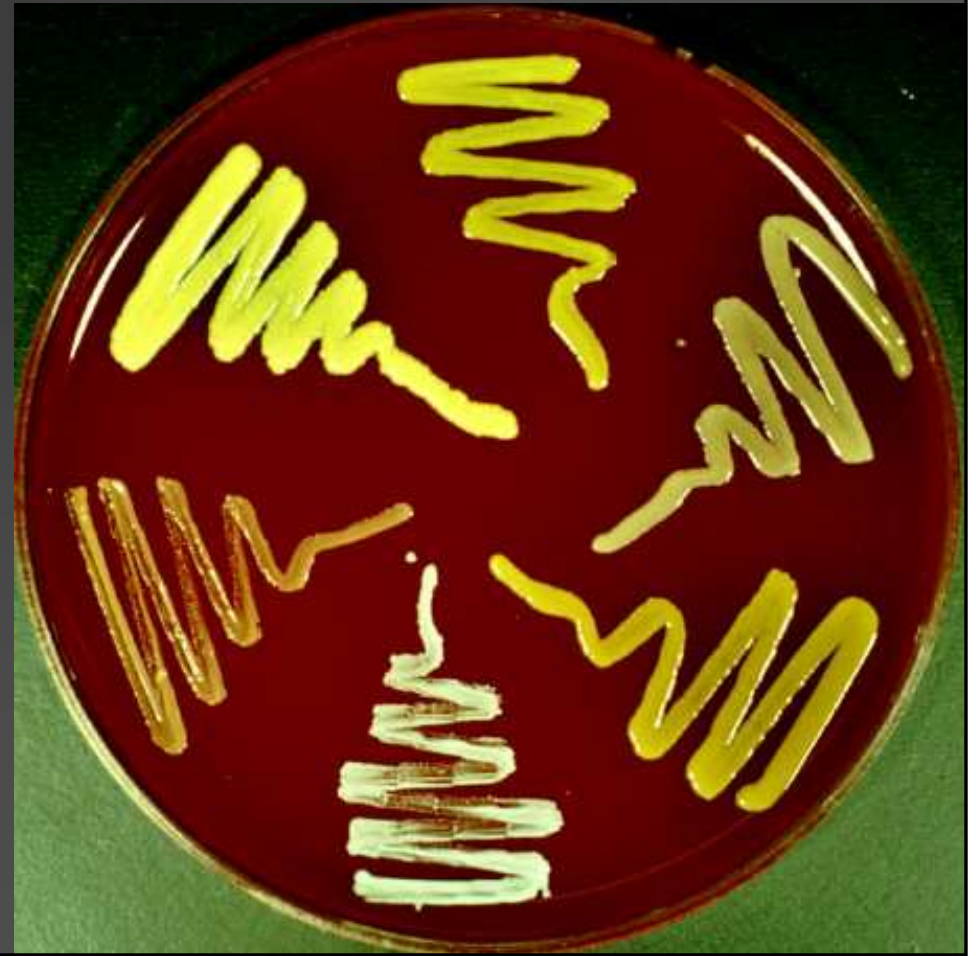


# Pro zvědavé: něco o mikrokokcích

- **Mikrokoky** se dlouho považovaly za blízké příbuzné stafylokoků. Nyní se však soudí, že příbuzné nejsou.
- Jsou to rovněž grampozitivní koky v malých shlucích, jsou však **oxidáza pozitivní**
- Dřívější rod *Micrococcus* se rozpadl do rodů *Micrococcus*, *Kytococcus*, *Kocuria*, *Nesterenkonia* a dalších. **Kocuria** se jmenuje pro prof. Kocurovi, brněnském mikrobiologovi

# Mikrokoky mají krásné pigmenty

- *Micrococcus luteus* je sírově žlutý (ne zlatý jako *Staphylococcus aureus*), *Kocuria rosea* je růžová
- V klinickomikrobiologické laboratoři je nacházíme jako kontaminaci.



Nashledanou při dalším dílu!

