

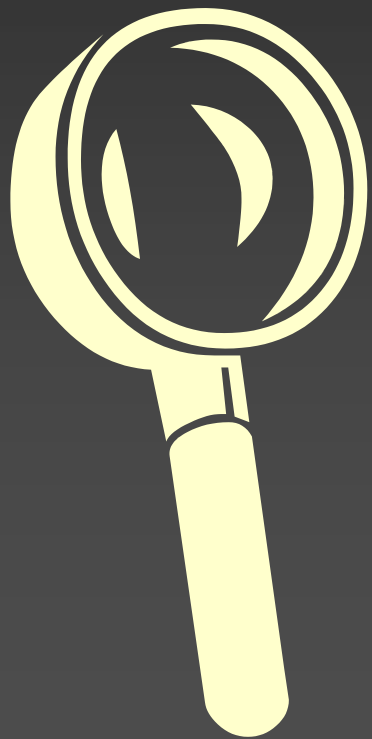


Vítejte po prázdninách

opět na mikrobiologickém ústavu!

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE

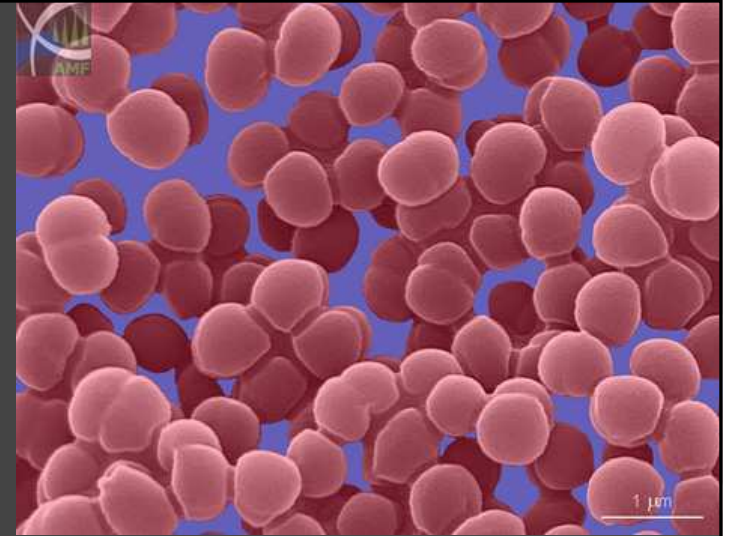


Díl první: Pachatelem je
stafylokok

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...

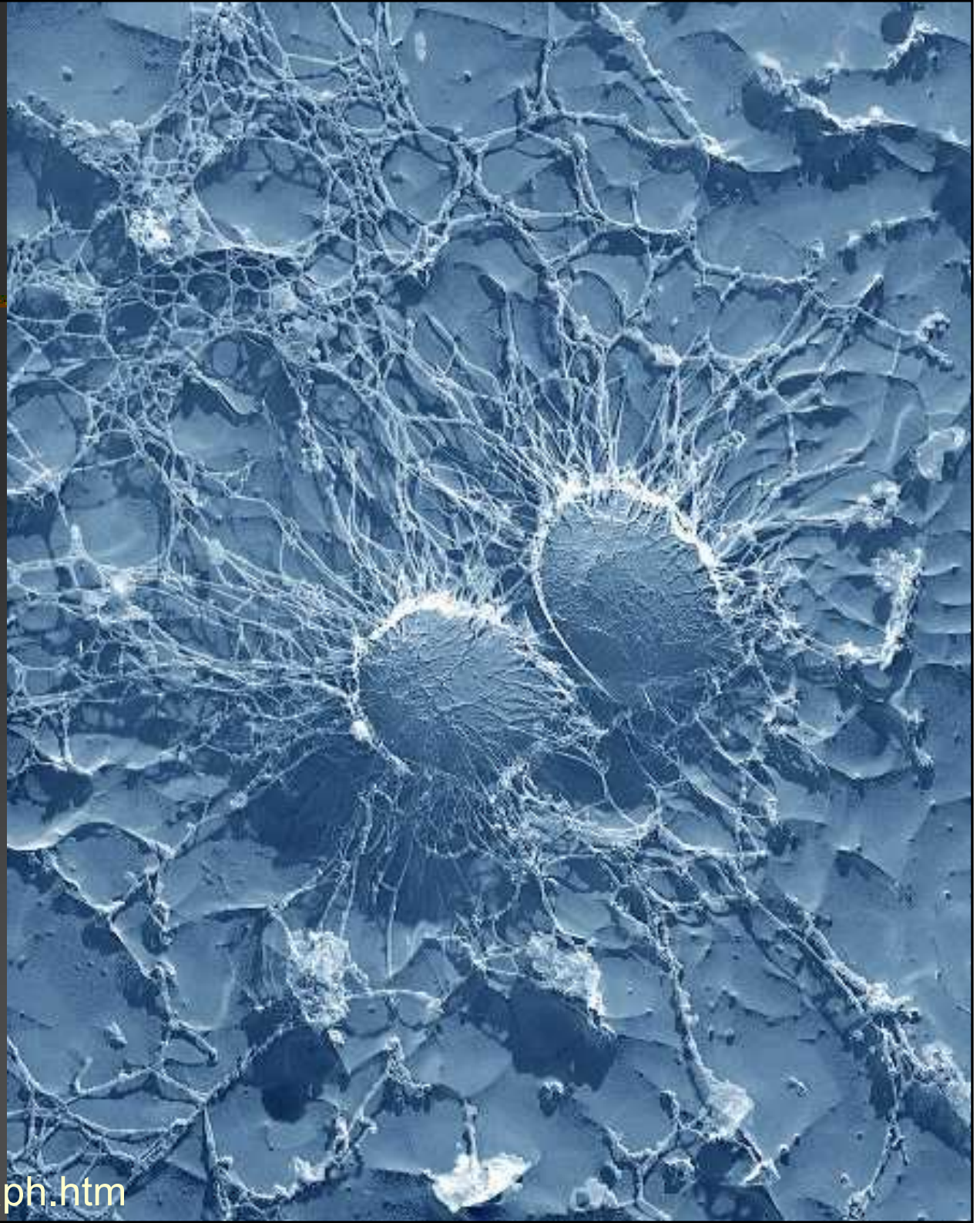


Kdo je vinen?

- 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

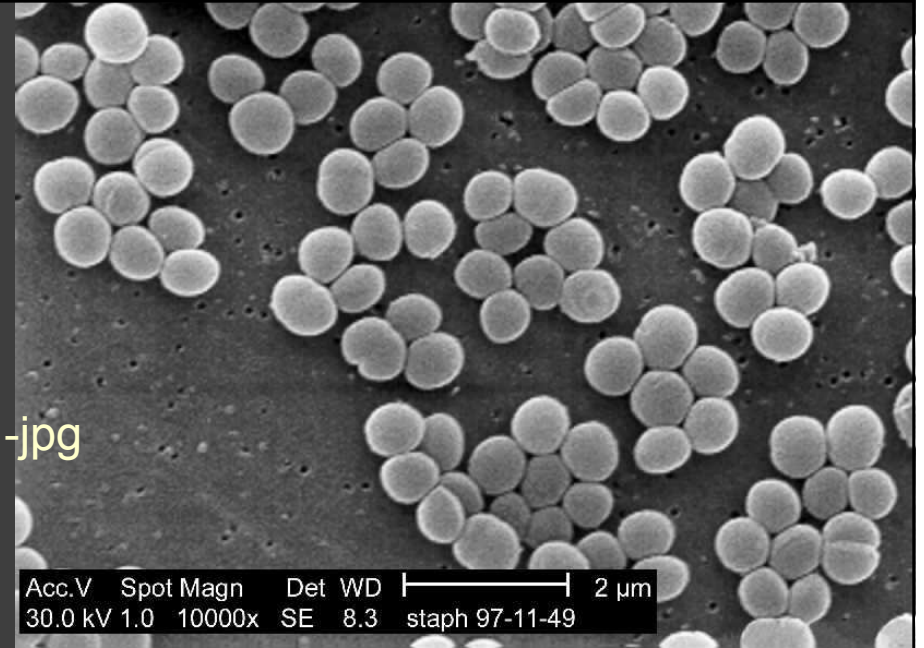
Vinna je ovšem také kuchařka, která nedodržela pravidla hygieny a nevšímal si puchýře!

- Desettisíckrát
zvětšený zlatý
stafylokok
v elektronovém
mikroskopu



Příběh druhý

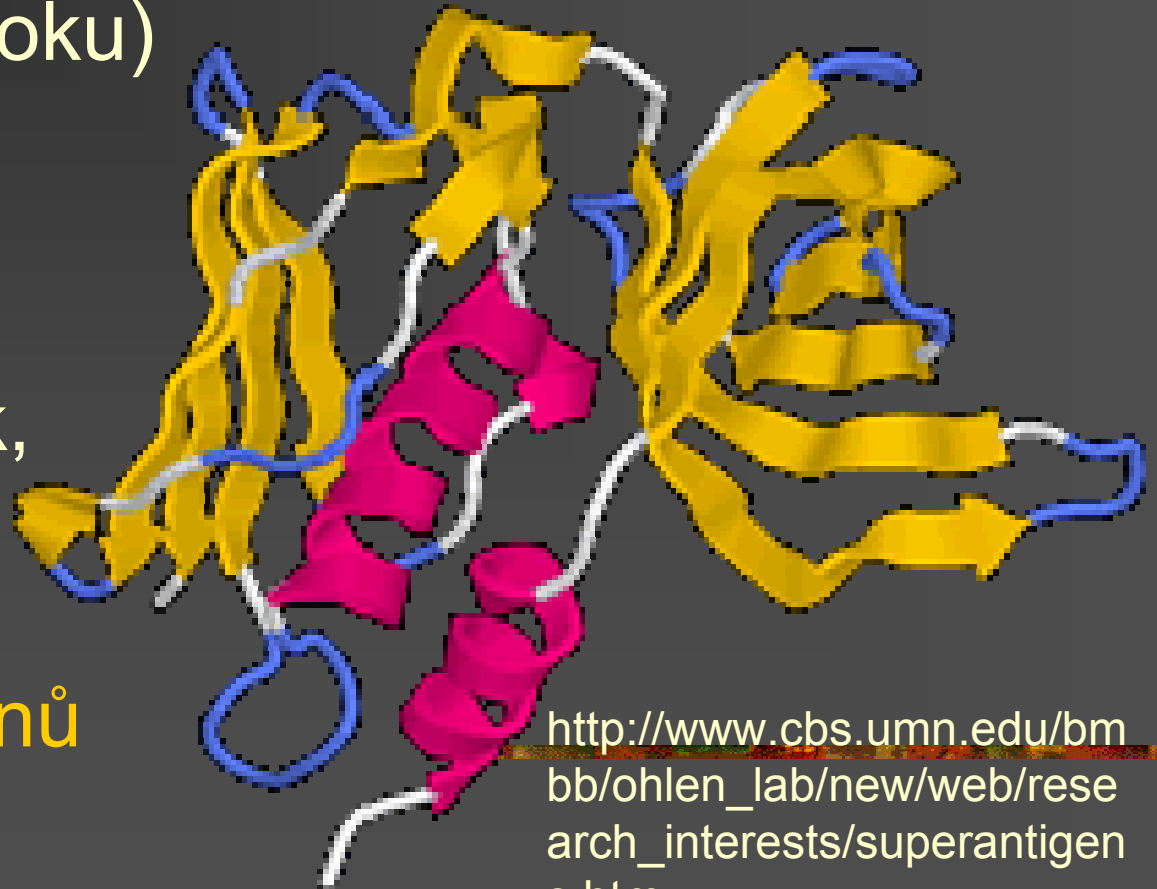
<http://www.answers.com/topic/staphylococcus-aureus-01-jpg>



- **Studentka P. Z.** je nervózní: opět na ni přišly „její dny“. Naštěstí má ty zlevněné 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?

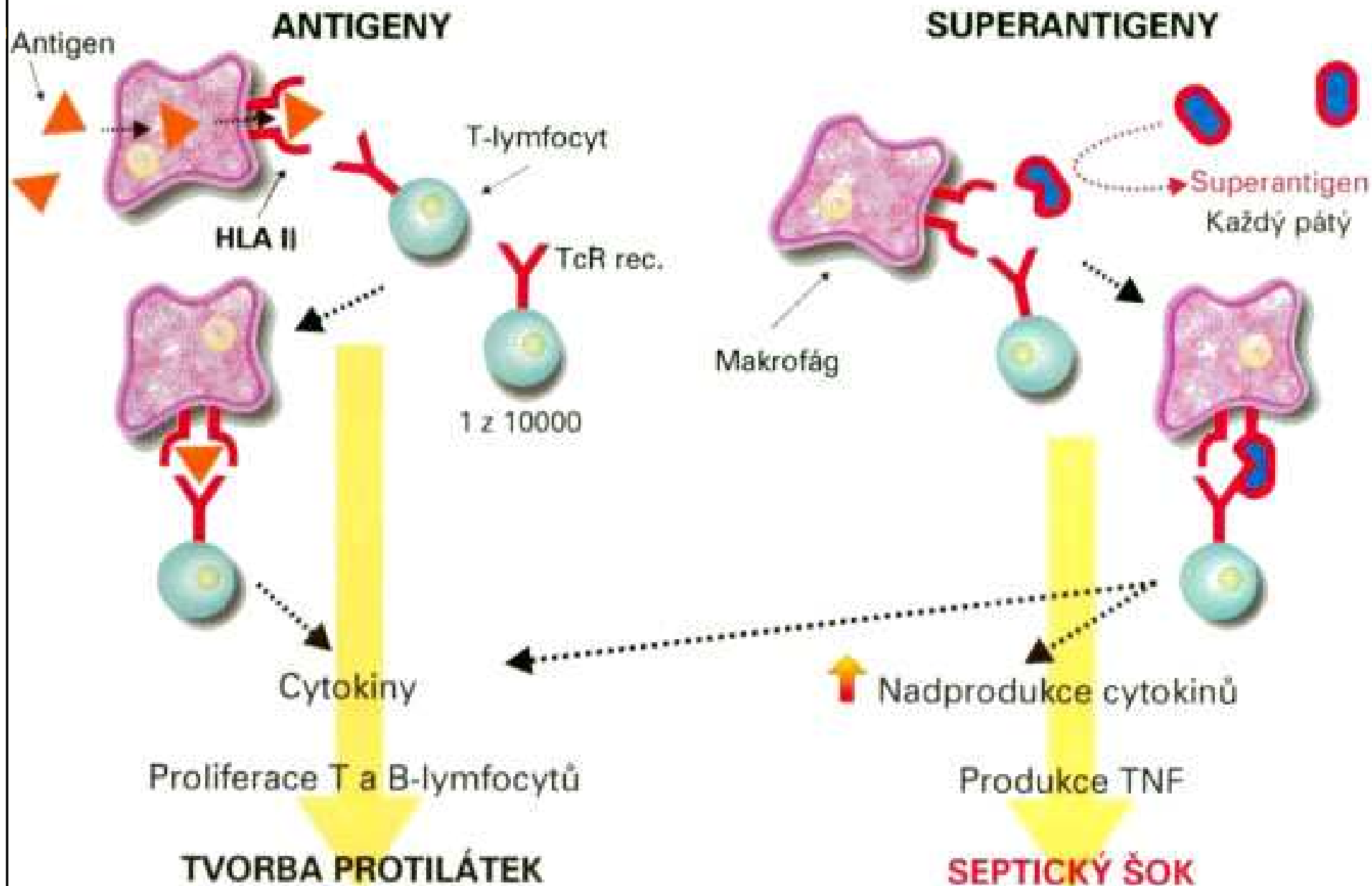
- Opět je viníkem *Staphylococcus aureus*, tentokrát kmen produkující toxin zvaný **TSST-1** (toxin syndromu toxického šoku)
- Také tento toxin je **superantigenem**
- Způsobuje toxický šok, typicky se vyskytuje u **uživatelék menstruačních tampónů**



http://www.cbs.umn.edu/bm/bb/ohlen_lab/new/web/research_interests/superantigen.htm

Superantigeny

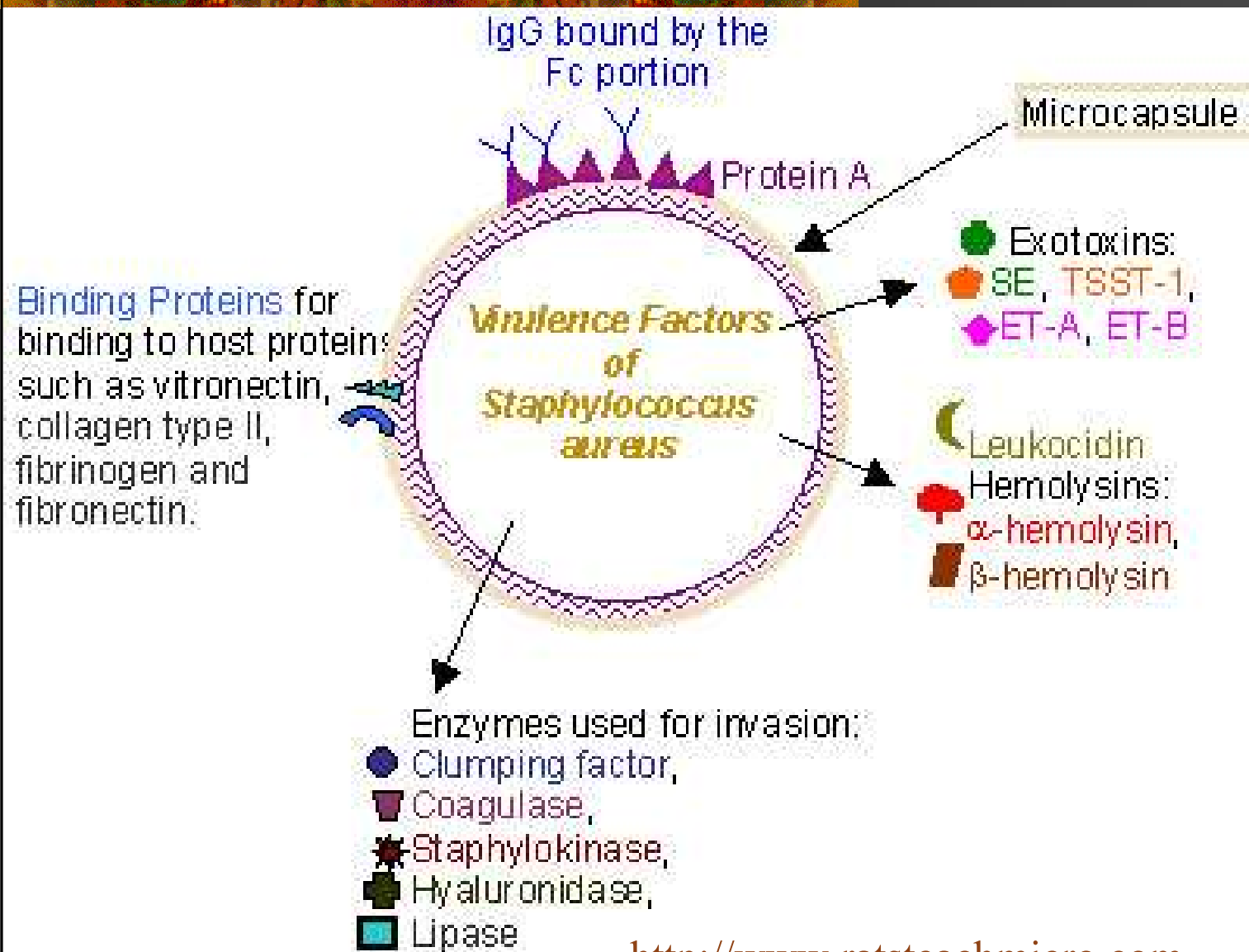
Imunitní odpověď



Staphylococcus aureus (zlatý stafylokok)

- Jediný pro člověka běžně významný z tzv. koaguláza pozitivních stafylokoků
- Původce infekcí kůže, chlupů, nehtů, otitis externa, zánětů spojivek, infekcí 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

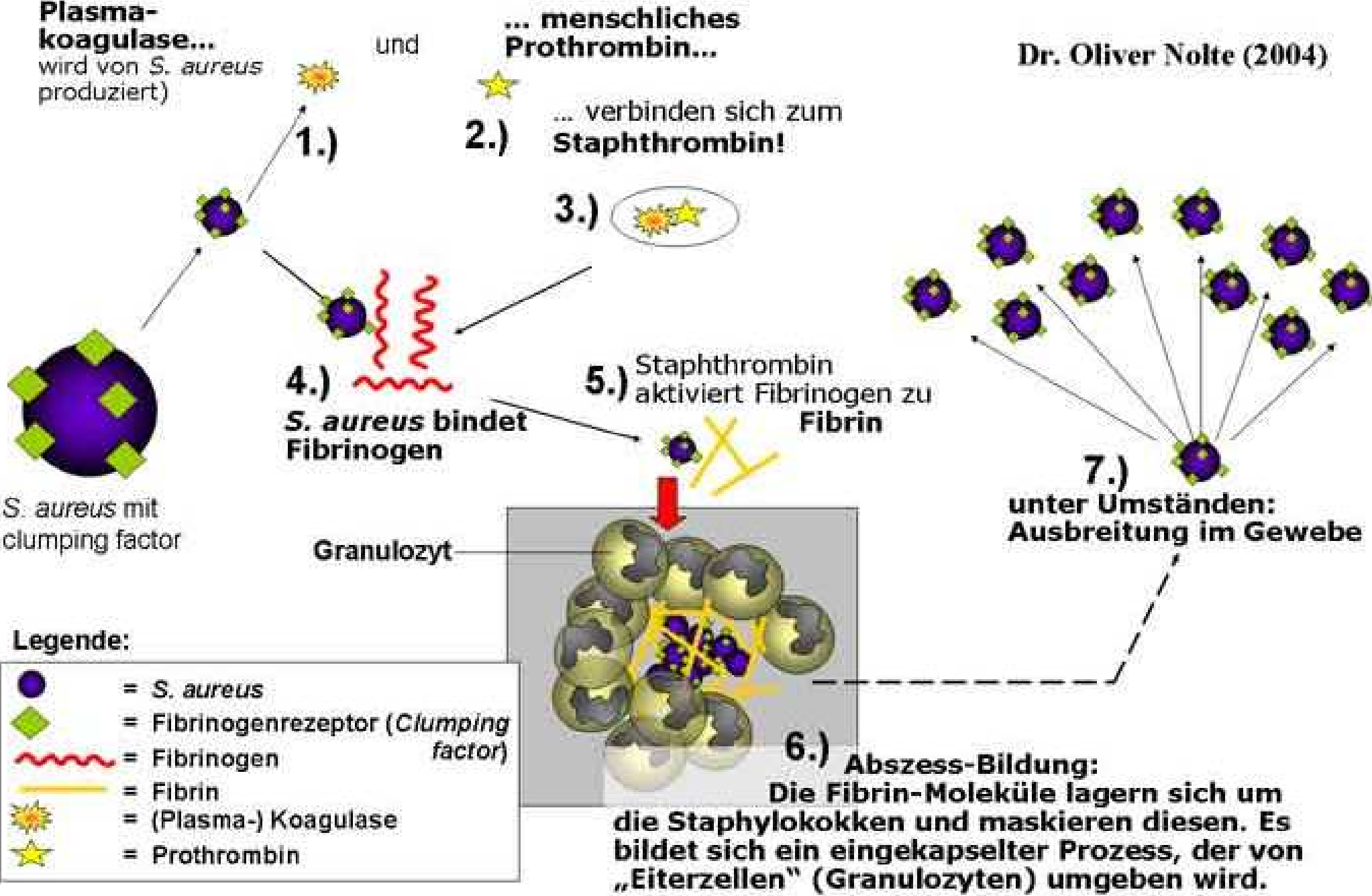
Faktorů virulence, nalézáných u *S. aureus*, je veliké množství...



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

Abscesy

- Na rozdíl od streptokoků, které vytvářejí ve tkáni zpravidla neopouzdrěné flegmóny, tvoří stafylokoky spíše opouzdrěné 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...



www.merck.com/mmpe/print/sec08/ch088/ch088c.html.

...či infekce kůže s krustami...

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

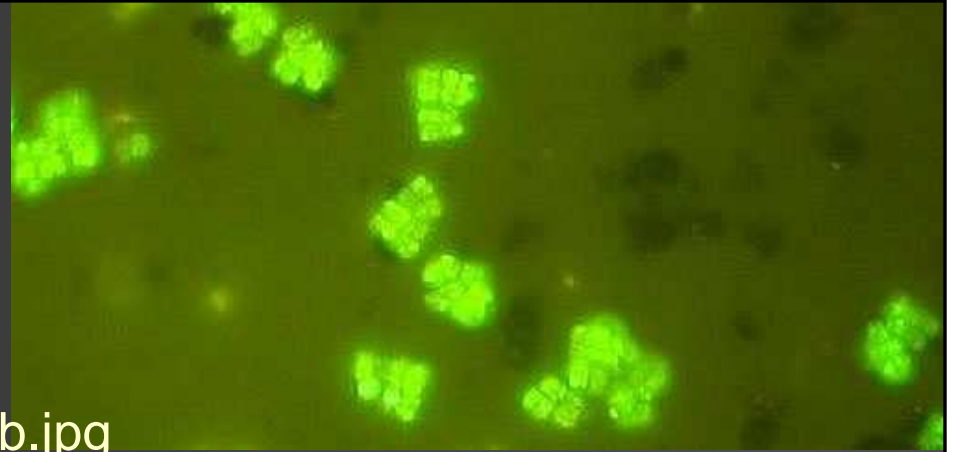


...ale také např. mozkové abscesy

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



Příběh třetí



<http://www.zuova.cz/informace/pic/ompovabac20b.jpg>

- **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?

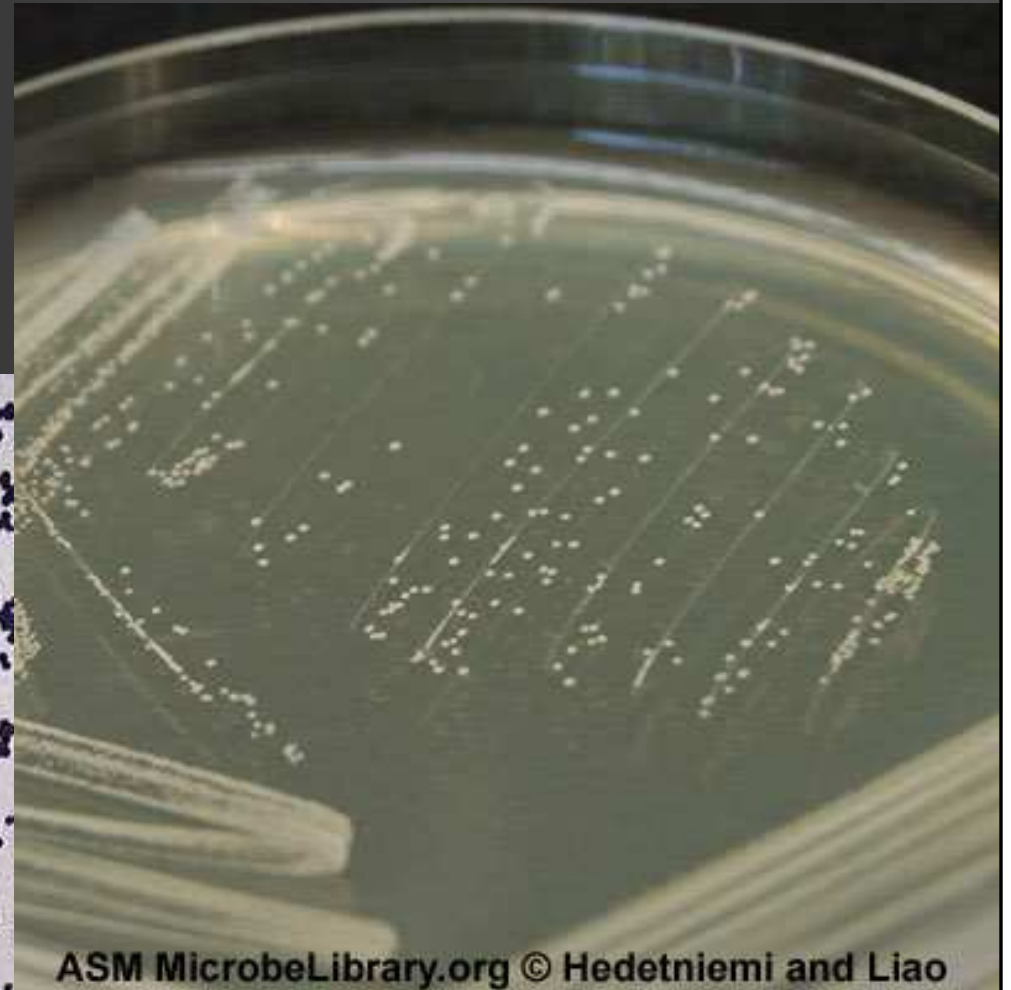
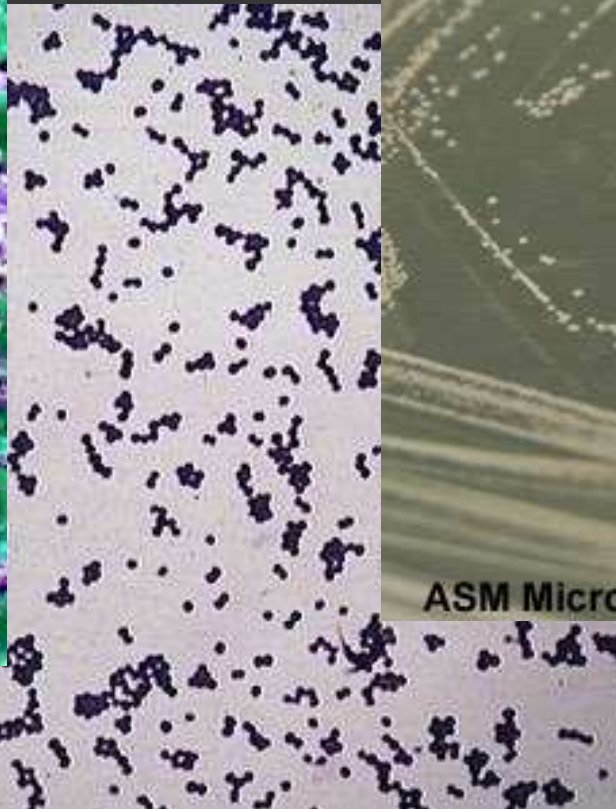
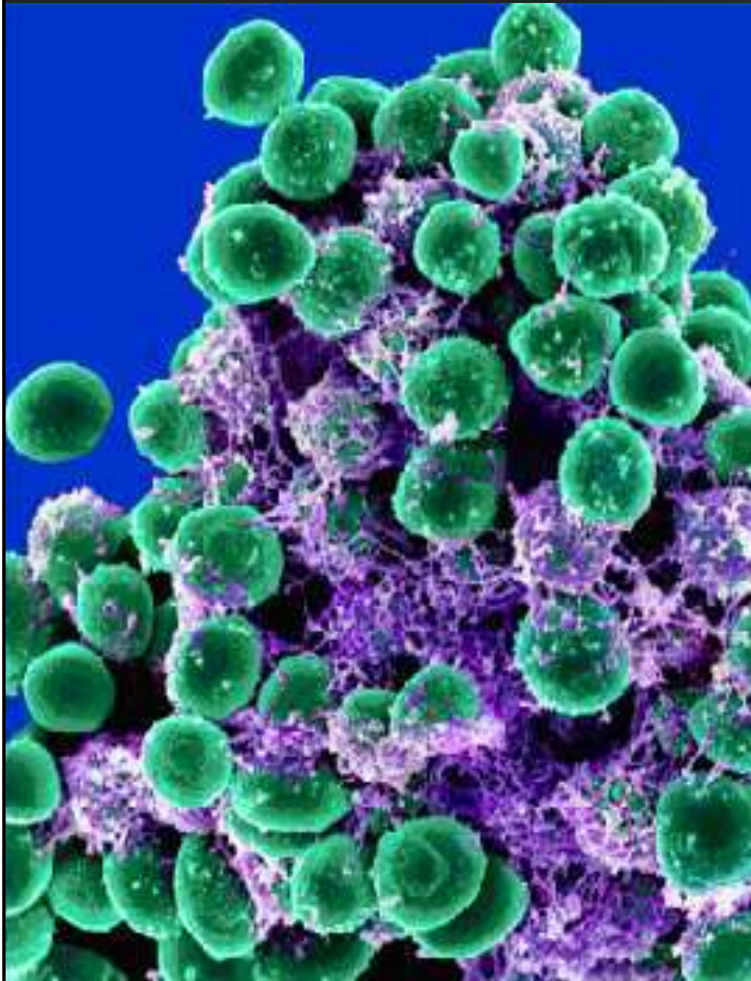
- Vinen je *Staphylococcus epidermidis*, nejběžnější z. takzvaných koaguláza negativních stafylokoků
- Koaguláza negativní stafylokoky patří do stejného rodu jako zlatý stafylokok
- Jsou mnohem méně patogenní než on
- V poslední době jsou však velice významnými původci infekcí u oslabených osob, zejména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

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

Staphylococcus epidermidis

<http://www.microbelibrary.org>

<http://www3.niaid.nih.gov>



ASM MicrobeLibrary.org © Hedetniemi and Liao

<http://www.difossombrone.it>

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, případně i infekcí ran, katetrových sepsí aj.
- Jejich nálezy se tedy hodnotí jinak např. ve výtěru v nosu či ve stolici, jinak v moči, a zcela jinak v hemokultuře.

Jak vypátrat viníka?

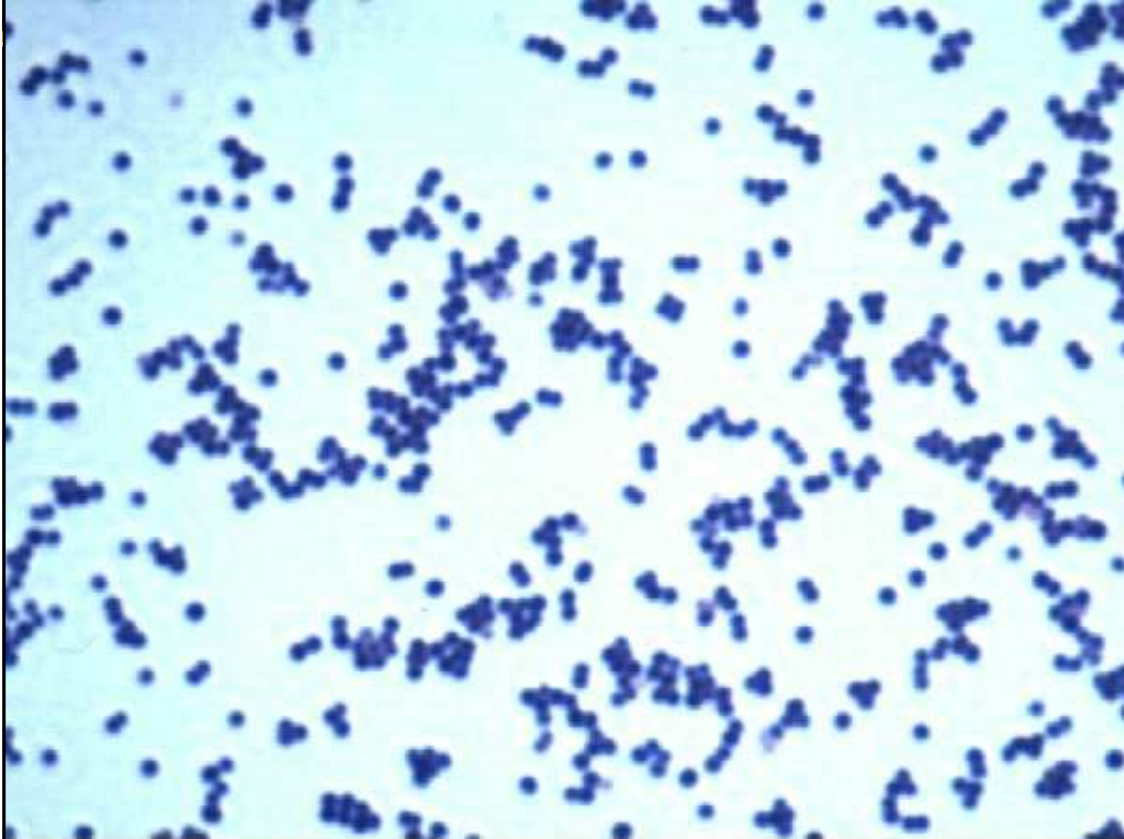


- Nejdříve si zopakujme kriminalistické **metody**, které jsme se naučili na jaře:
- **Přímé metody** jsou mikroskopie, kultivace, biochemické identifikační metody, průkaz antigenu, průkaz DNA, pokus na zvířeti apod.
- Přímé metody aplikujeme na **vzorek** (přímý průkaz ve vzorku) nebo na **kmen** (identifikace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

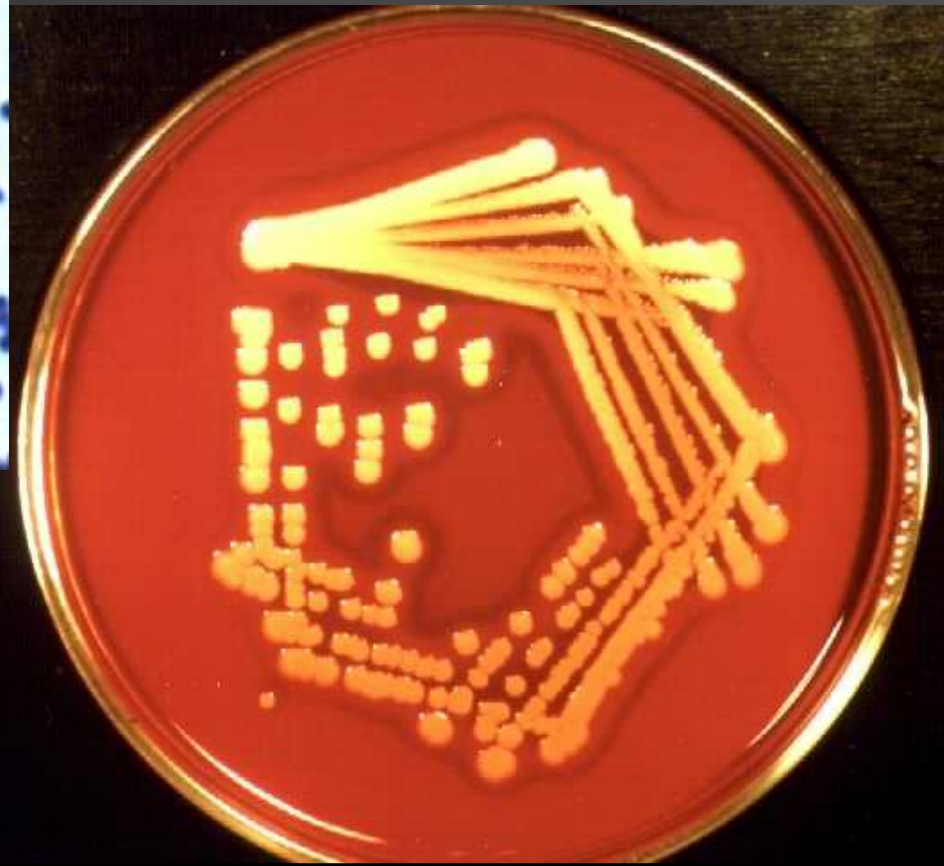
Popis pachatele (diagnostika)

- **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



www.medmicro.info (stránky ústavu)



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*

Katalázový test (pro připomenutí)



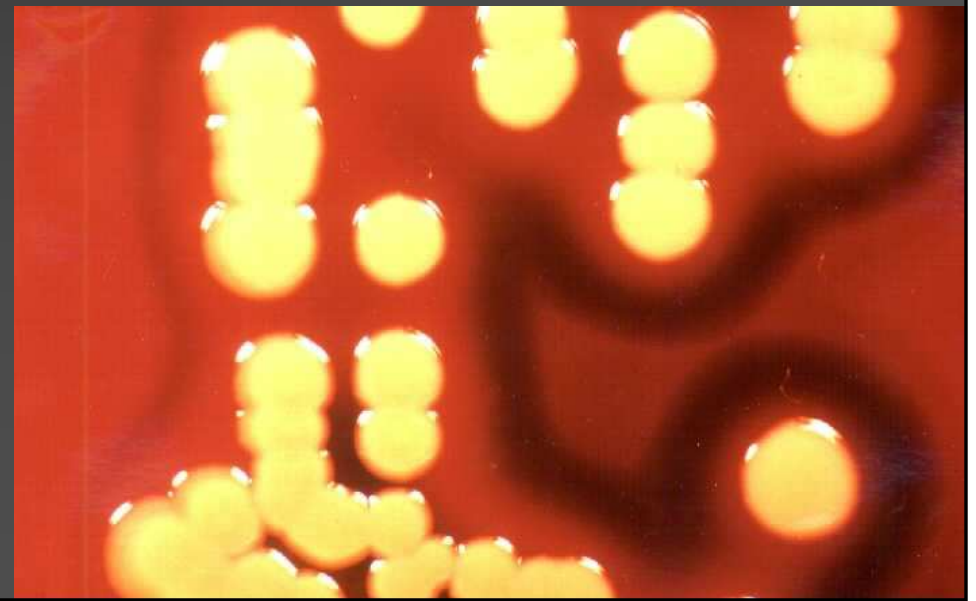
<http://memiserf.medmikro.ruhr-uni-bochum.de>

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 zbarvení 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)



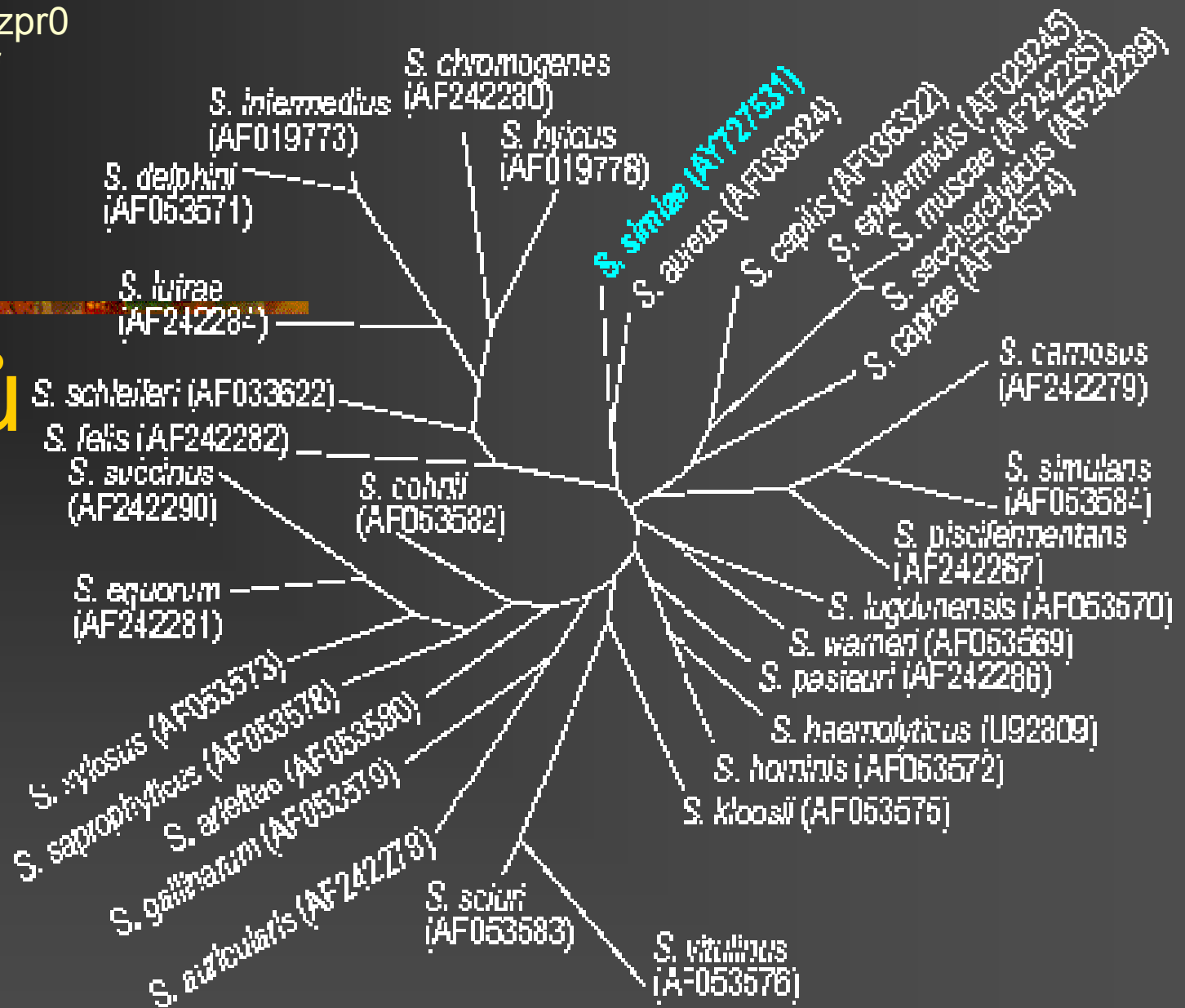
Podle situace
používáme buď

← kvalitativní, nebo

kvantitativní testy →



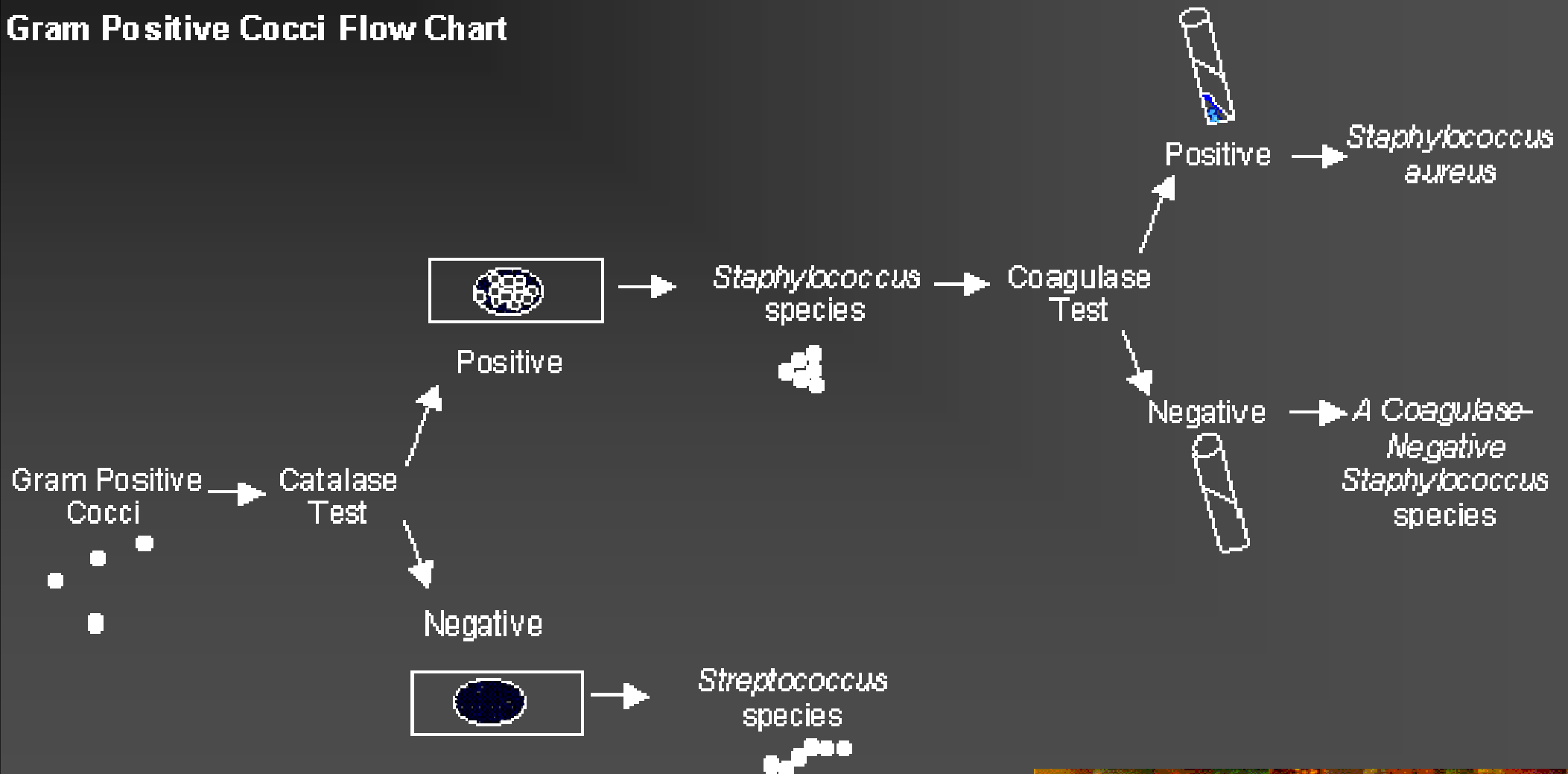
Stafylokoků je dnes mnoho druhů



- Např. *S. simiae* byl objeven moravskými vědci z řitních výtěrů kotulů veverovitých v ZOO na Svatém Kopečku u Olomouce

Přehled diagnostiky (zjednodušeně)

Gram Positive Cocci Flow Chart



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

Katalázový test

CATALASE TEST

<http://www.telmeds.org>

Negative



Positive

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, bakterií 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
- Pozitivita se projeví jako tvorba „chuchvalců“ v kapce plasmy (viz obrázky na další obrazovce)
- Nejde vlastně o KOAGULACI, ale o AGLUTINACI plasmy
- Test není příliš spolehlivý

Clumping-Factor positiv



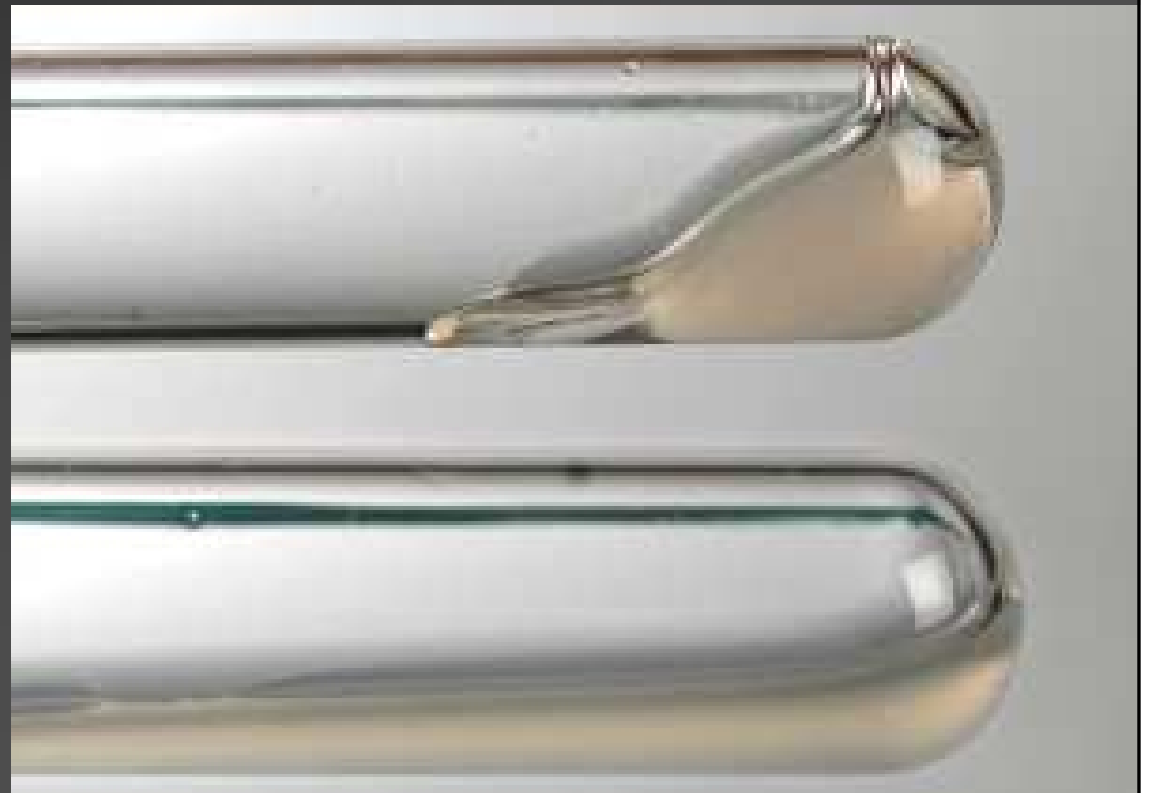
<http://memiserf.medmikro.ruhr-uni-bochum.de>

Clumping-Factor negativ



6 b): Volná koaguláza – klasika

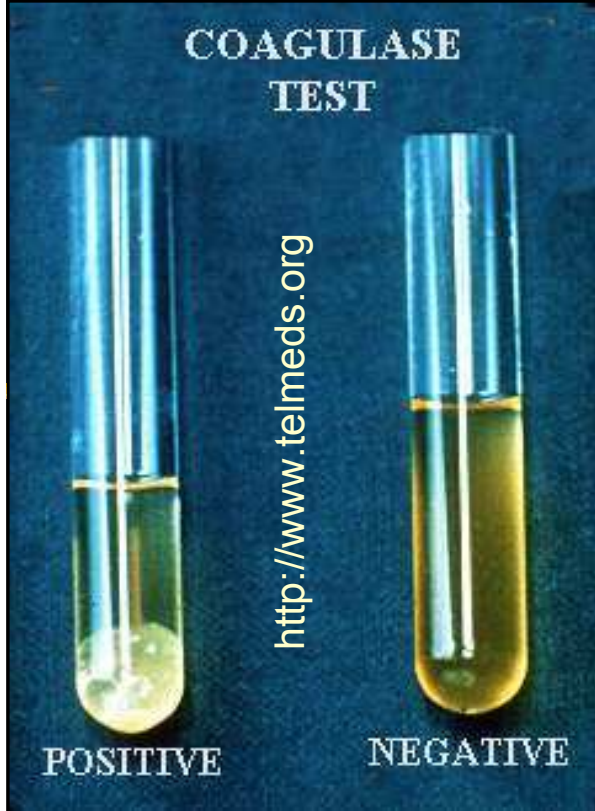
- Nejklasičtější z testů pro odlišení zlatého stafylokoka (koaguláza pozitivního stafylokoka)
- Kličkou nabrané kolonie vmícháme do králičí plasmy ve zkumavce
- Pokud plasma koaguluje (má konzistenci želé), je kmen koaguláza pozitivní



Dejte pozor, co nakreslíte do protokolu!

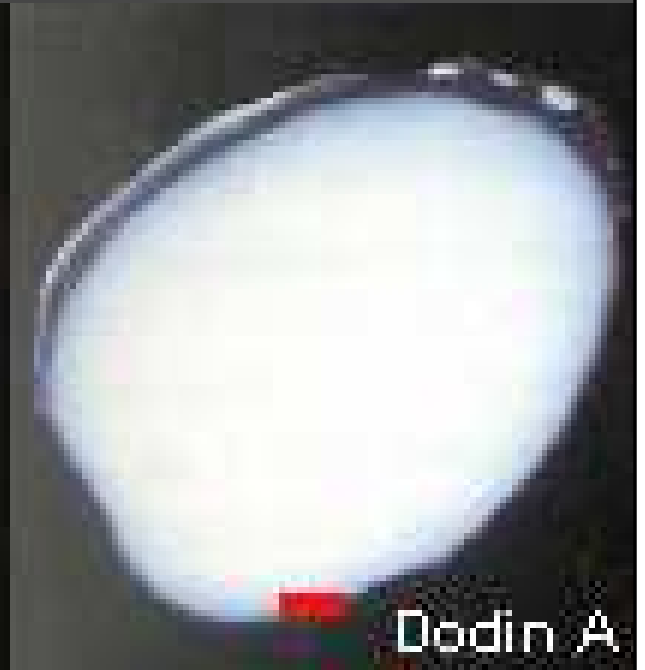
- Důležité je zakreslit, že negativní výsledek znamená, že ve zkumavce zůstává vodorovná hladina
- Při pozitivním výsledku se tekutina buďto celá změní na konzistenci želé, nebo popř. je patrná „želé“ uvnitř tekutiny, viz obrázky
- Tento úkol je častým předmětem zájmu pana profesora Votavy při prohlížení protokolů u zkoušky z mikrobiologie!

Další obrázky plasmakoagulázy



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

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

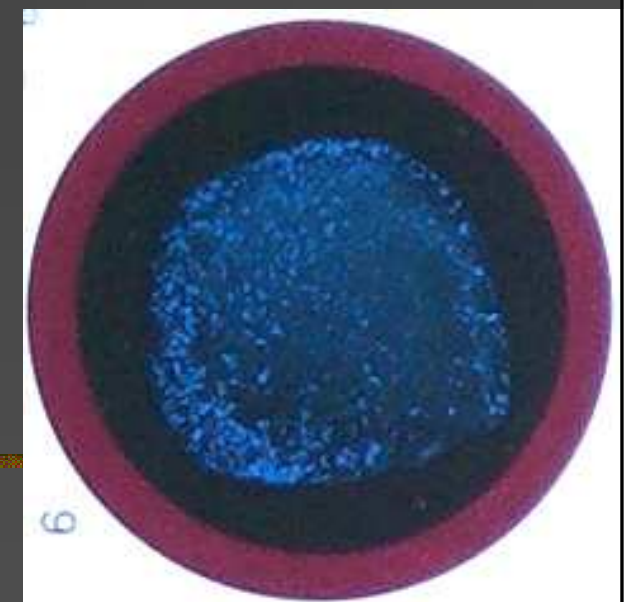
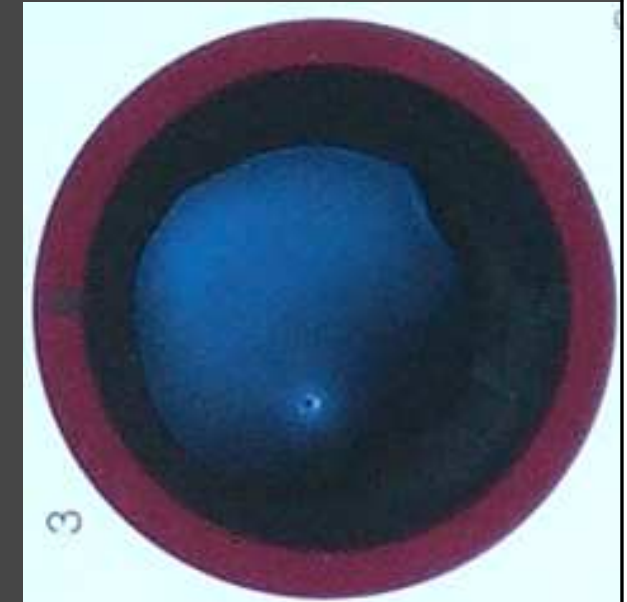


www.microbes-edu.org

Souprava Staphaurex a výsledky

<http://www.pathologyinpractice.com>

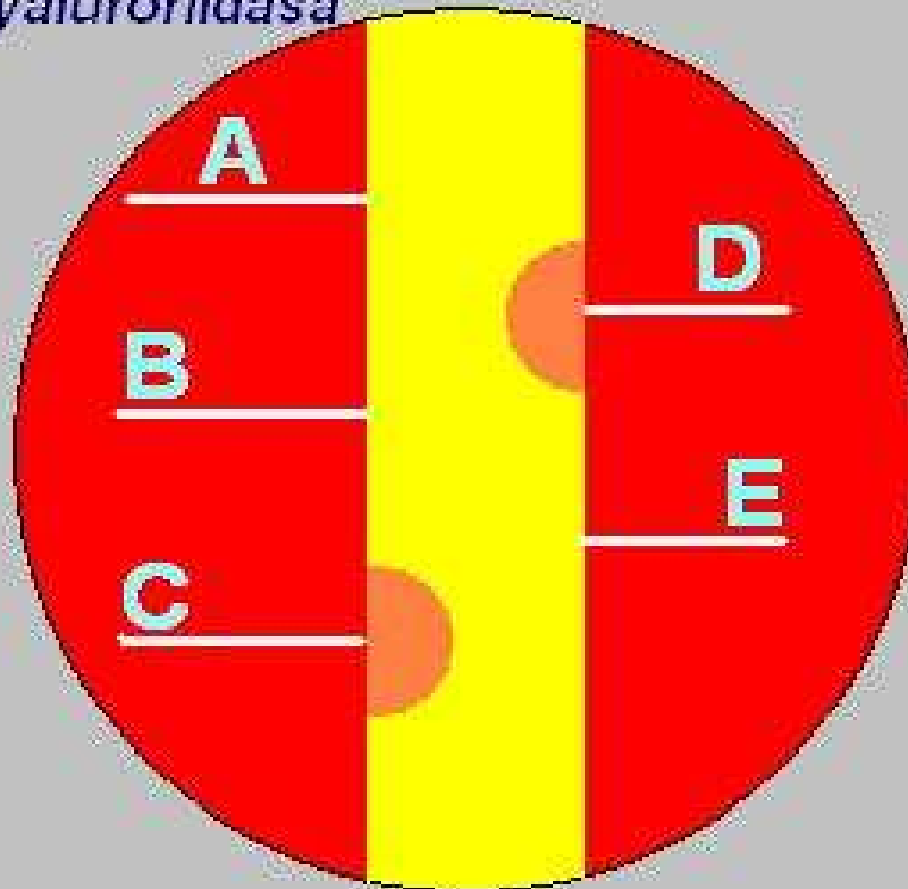
www.microbes-edu.org



8: Hyaluronidáza (test dekapulace) (Úkol 7 zatím přeskočíme)

- Eleganční 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

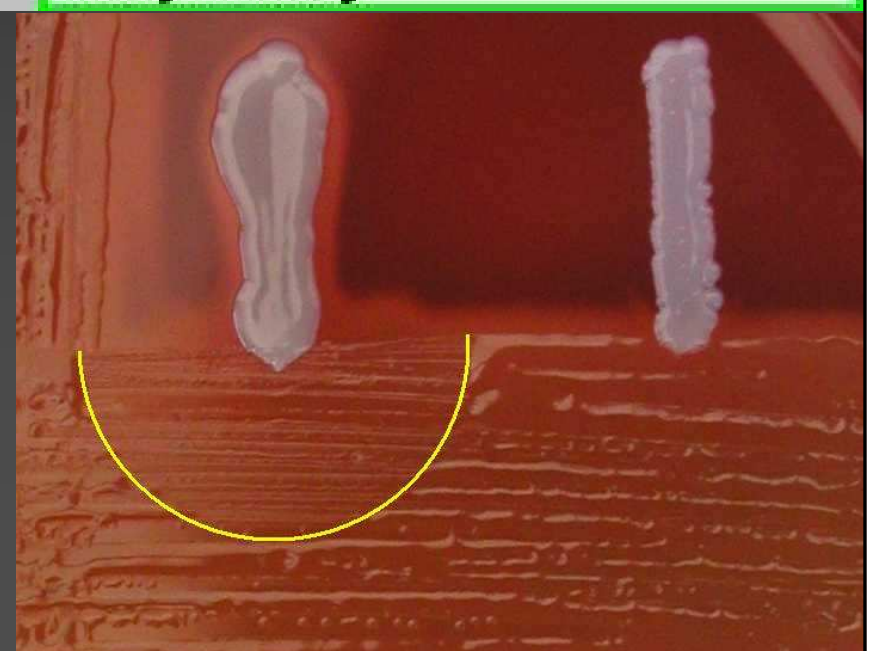
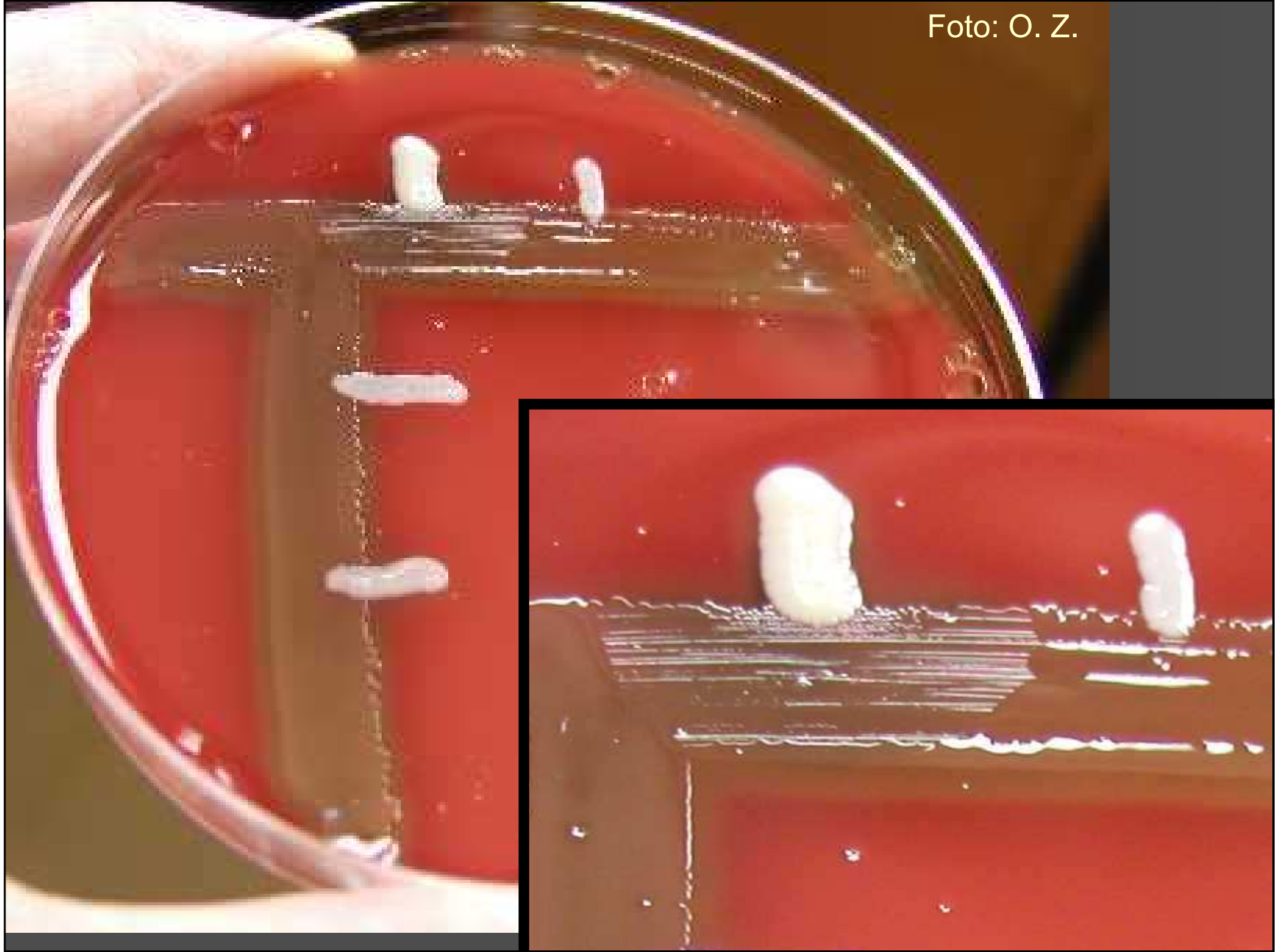


Foto: O. Z.



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 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, 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 = negativní
- 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	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	
		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			

Api Staph – zahraniční obdoba našich STAPHYtestů 16

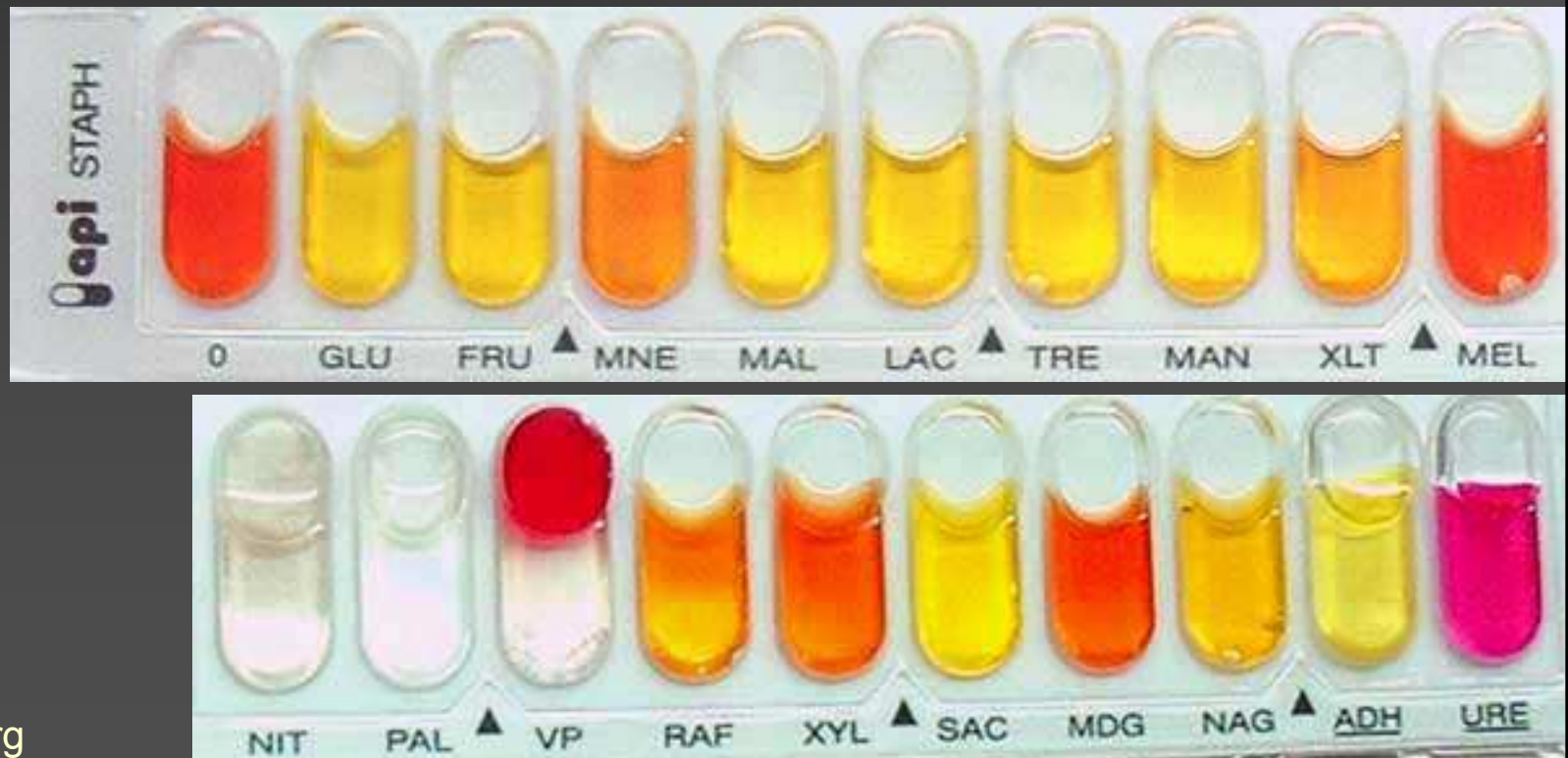
- Bez ohledu na provenienci konkrétního testu zůstává princip stejný – kombinace většího počtu enzymatických reakcí, které se projeví změnou zbarvení reakčního důlku

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



Jiná varianta testu API-Staph

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



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 šestici antibiotik (OX = oxacilin, VA = vankomycin, RD = rifampicin, KF = cefalotin, MY – linkomycin CN = gentamicin). (V praxi se používají dvě šestice, označované S1 a S2, tato naše je kombinací obou z nich)
- Každý set je proveden na kmen STKN (koaguláza negativního stafylokoka) a STAU (zlatého stafylokoka).

Odečtení testu citlivosti

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Oxacilin (protistaf. penic.)	OX	13/18 mm
Vankomycin (glykopeptid)	VA	12 mm
Rifampicin (rifamycin)	RD	20 mm
Cefalotin (cefalosp. 1. g.)	KF	18 mm
Linkomycin (linkosamid)	MY	21 mm
Gentamicin (aminoglyk.)	CN	15 mm

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

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

Ilustrační foto

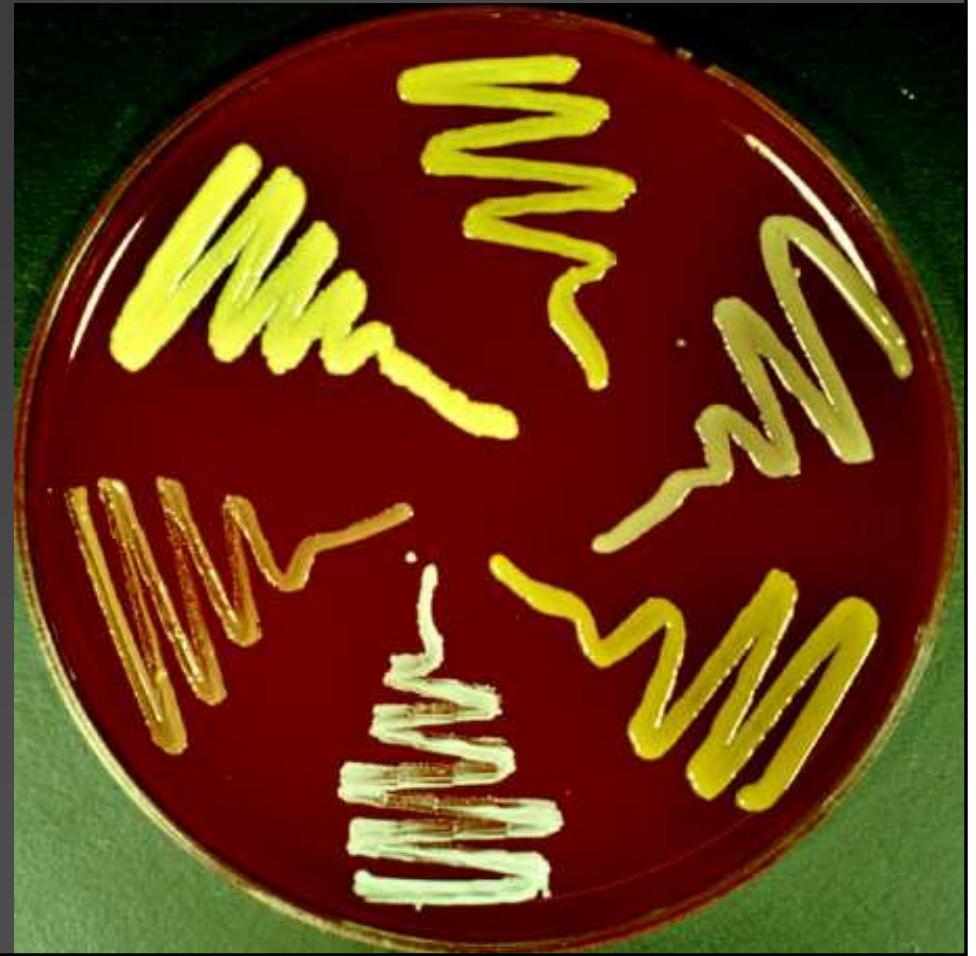


Pro zvědavé: něco o mikrokokcích

- **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!



Oběť
stafylokokové
infekce