

**Téma P01: Diagnostika stafylokoků****K nastudování: Rod *Staphylococcus*. (z internetu, učebnic apod.)****Z jarního semestru: Mikroskopie, Kultivace, Biochemická identifikace.****Úkol 1: Mikroskopie infekčního materiálu**

V mikroskopu sledujte preparát obarvený podle Grama. Popište a zakreslete sledované útvary. Všimněte si přítomnosti bakterií (jejich tvaru, barvitelnosti a množství) dále také leukocytů, epitelů a vzájemného poměru mezi nimi.

Popis (napište názvy útvarů a spojte je šipkami s objekty nakreslenými vlevo)

---



---



---



---

**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 „-“)					
<b>DÍLČÍ ZÁVĚR</b>					
Úkol 6a: Test clump. faktor (+/-)					
Úkol 6b: Plasma-koaguláz. test (+/-)					
Úkol 6c: Test hyaluronidázy (+/-)					
Úkol 7: STAPHYtest 16					
<b>KONEČNÝ ZÁVĚR</b>					

**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 v řádku Úkol č. 3. Do „jiných“ napište to zajímavé, co se nevejde jinem.

### 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na podložním skličku. Zaznamenejte reakci u všech kmenů. Do tabulky pište „+“ a „-“.

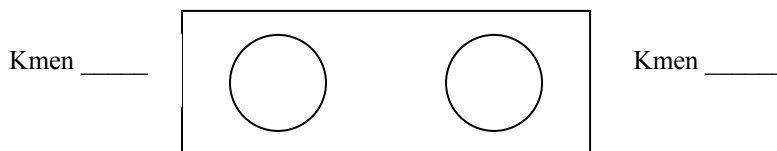
Pozitivitu charakterizují \_\_\_\_\_, zatímco \_\_\_\_\_ je negativní.

Nyní vyplňte řádek „Dílčí závěr“. Napište STAF, pokud se kmen ukázal být stafylokokem, a JINÝ, pokud je to něco jiného.

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

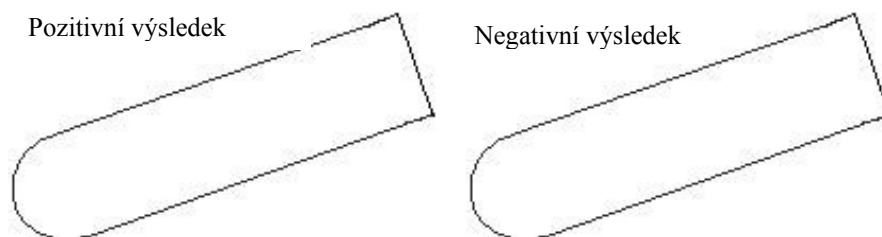
#### 6a) Test na clumping faktor (test vázané plasmakoagulázy)

Na podložní skličku kápněte kapku ředěné králičí plazmy. Pomocí sterilní mikrobiologické kličky v ní suspendujte vyšetřovaný kmen stafylokoka. Přítomnost plasmakoagulázy se projeví aglutinací bakteriálních buněk. Výsledek vyšetření zaznamenejte.



#### 6b) Plasmakoagulázový test (test volné plasmakoagulázy)

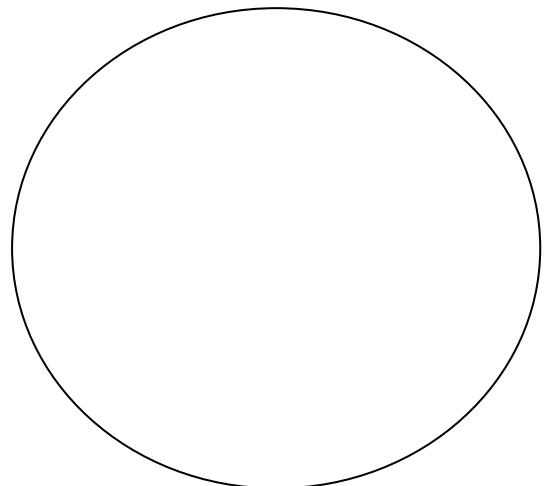
Do 0,5 ml 10× ředěné králičí plazmy bylo suspendováno několik kolonií vyšetřovaného kmene stafylokoka. Suspenzi inkubujeme v termostatu při 37 °C. Výsledek se odečítá po 1, 2 a 24 hodinách. Jako pozitivní reakce se hodnotí, pokud dojde ke koagulaci králičí plazmy ve zkumavce, tj. dojde k zrosolování celého obsahu zkumavky, příp. alespoň části. Zapište a zakreslete výsledek této reakce u vybraných kmenů po 24 hodinách inkubace.



#### 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 hyaluronidasa 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)**

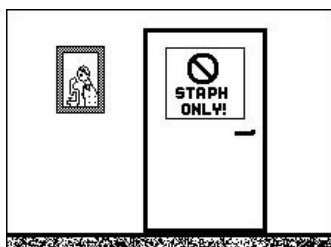
Pro identifikaci stafylokoků je určena sada biochemických testů. Podle návodu k použití odečtete výsledky jednotlivých reakcí. Názvy testů i jejich výsledky pro jednotlivé kmeny zapište a na základě interpretačních tabulek zjistíte, o které druhy stafylokoků jde. Začátek výsledků pro první kmen máte předvyplněn.

	VPT	1H	1G	1F	1E	1D	1C	1B	1A	2H	2G	2F	2E	2D	2C	2B	2A
<b>K</b>	+	+	+	-	-	-	+	+	-								
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	7			0			3										
	Kód:						Identifikace <i>Staphylococcus</i>						% pravděpod.		T index		
	VPT	1H	1G	1F	1E	1D	1C	1B	1A	2H	2G	2F	2E	2D	2C	2B	2A
<b>L</b>																	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	Kód:						Identifikace <i>Staphylococcus</i>						% pravděpod.		T index		

**Úkol 8: Citlivost stafylokoků k antibiotikům**

Zjistěte citlivost předložených kmenů stafylokoků k vybraným antibiotikům, pomocí diskového difusního testu. Citlivost k předkládaným antibiotikům zhodnoťte na základě srovnání zjištěného průměru inhibiční zóny s příslušnou hraniční zónou. Seznam testovaných antibiotik a hodnoty jejich hraničních zón najdete v příložené tabulce. Výsledky testu pro jednotlivá antibiotika (průměr inhibiční zóny i interpretaci) zapište.

Antibiotikum (plný název, ne zkratka)	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	Průměr zóny (mm)	Interpretace	Průměr zóny (mm)	Interpretace



**Kontrolní otázky**

1. Které jsou klinicky významné grampozitivní koky? Uveďte alespoň dva způsoby, jak odlišíte stafylokoky od ostatních dvou klinicky nejvýznamnějších rodů.

2. Jak odlišíme *S. aureus* od tzv. koagulázanegativních stafylokoků?

<i>S. aureus</i>		Koaguláza negativní stafylokoky
<b>a) orientační znaky, používané pro předběžnou diagnostiku</b>		
	<i>velikost shluků v mikroskopu (menší, větší)</i>	
	<i>barva kolonií</i>	
	<i>hemolýza (zpravidla)</i>	
<b>b) spolehlivější rozlišovací testy (pište názvy testů); uveďte alespoň jeden, který jsme v praxi nedělali</b>		
<i>pozitivní výsledek</i>		<i>negativní výsledek</i>

3. Který koagulázanegativní zástupce rodu *Staphylococcus* je uváděn jako častý původce uroinfekcí, zejména u mladých žen?

4. Způsobují stafylokoky spíše abscesy, nebo spíše flegmóny? Uveďte rozdíl mezi abscesem a flegmónou.

5. Které antibiotikum byste použili k léčbě stafylokokové infekce v případě

- a) většiny stafylokokových infekcí, například pneumonie
- b) stafylokokového zánětu močového měchýře
- c) osteomyelitidy

*(Vyhledejte si u jednotlivých protistafylokokových antibiotik, jak pronikají do moče a do kostí)*

6. Co je to MRSA a jaké přináší problémy při terapii stafylokokových infekcí? Jaký je u MRSA mechanismus rezistence?