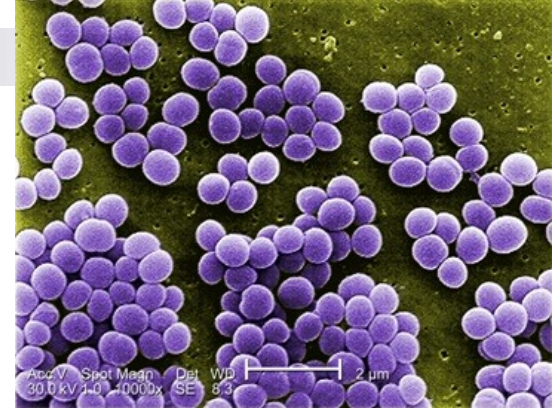


P01

Diagnostika stafylokoků

Mikrobiologický ústav LF MU

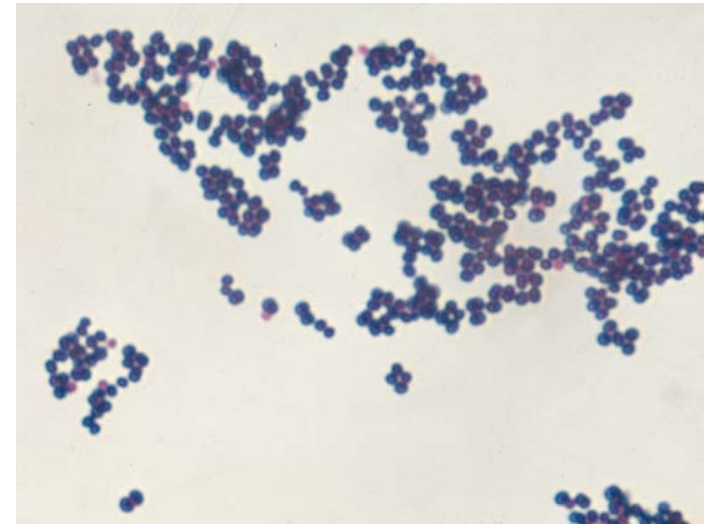
Stafylokoky



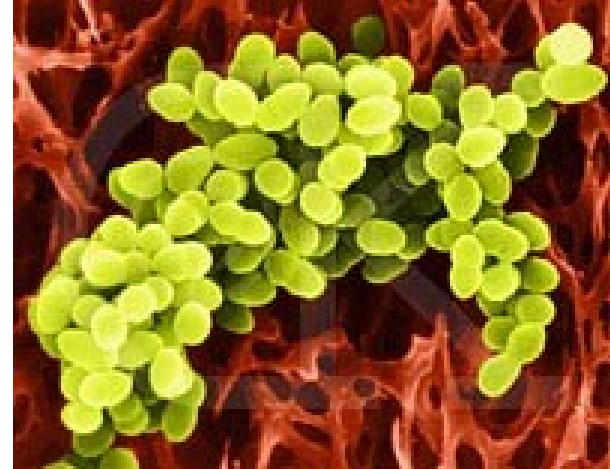
Grampozitivní koky, nejčastěji ve shlucích tvaru hroznů, nepohyblivé

Rozdělení podle koagulace plazmy na

- koaguláza pozitivní (*S. aureus*)
- koaguláza negativní



Patogenní stafylokoky



Staphylococcus aureus

název z řeckého staphylé = hrozen

Jediný pro člověka běžně významný z tzv.
koaguláza pozitivních stafylokoků

Tento „zlatý stafylokok“ s oblibou způsobuje
hnisavé infekce kůže
a kožních adnex, otravy
z potravin



***S. aureus* produkuje různé toxiny:**

Hemolyzin ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) – způsobují hemolýzu erytrocytů

koaguláza – sráží krevní plazmu; *znak patogenních stafylokoků*

fibrinolysin – rozpouští fibrinové sraženiny

leukocidin (*PV toxin*) – lýza leukocytů

deoxyribonukleáza – *znak patogenních stafylokoků*

enterotoxiny – jsou produkovány v potravinách; způsobují zvracení a průjemy

hyaluronidáza – enzym, který produkují stafylokoky a usnadňuje invazivitu

Další faktory virulence

adherence (přilnutí), *pouzdro* (proti fagocytóze), tvorba biofilmu, PBP2a, enzymy degradující ATB beta-laktamázy aj.

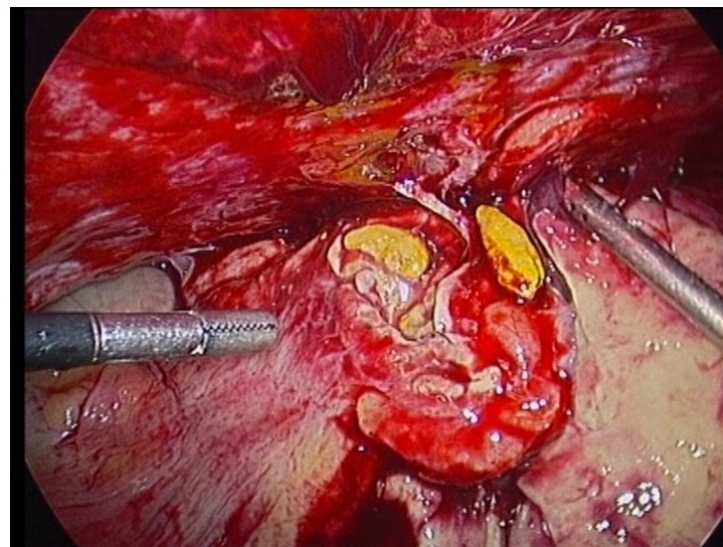
Abscesy

Na rozdíl od streptokoků, které vytvářejí ve tkáních zpravidla **neopouzdržené flegmóny**, tvoří stafylokoky spíše **opouzdržené abscesy** (dutina plná hnisu)

hnisavé infekce ran



hnisavé infekce měkkých
tkání - abscesy



hnisavé infekce tvrdých tkání - osteomyelitis



infekce močových cest

infekce dýchacích cest, pneumonie

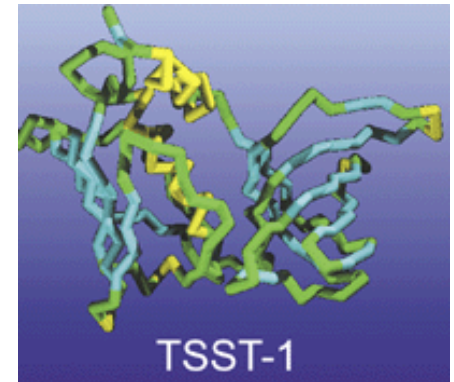
bakteriémie a sepse

katérové infekce krevního řečiště infekce a dalších
implantátů - biofilm

Toxiny

Některé kmeny produkují enterotoxiny
entotoxikóza (intoxikace bakteriálním toxinem se,
na rozdíl od střevní infekce, projeví velice rychle;
obvykle také rychle odezní)

TSST-1 (toxin syndromu toxického šoku)
- způsobuje toxický šok



Exfoliativní toxiny (epidermolyziny)
- stafylokokový syndrom opařené kůže



Stafylokoky s nízkou patogenitou

-nejběžnější z tzv. **koaguláza negativních stafylokoků** (CoNS) je ***Staphylococcus epidermidis*** (30 – 90 % izolátů)

-další, klinicky významní CoNS: *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. sciuri*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*

-Koaguláza negativní stafylokoky jsou součástí normální mikroflóry, zejména kůže

-v poslední době jsou velice významnými původci infekcí u oslabených osob, zejména nemocničních

způsobují: - infekce moč. cest (*S. saprophyticus*)

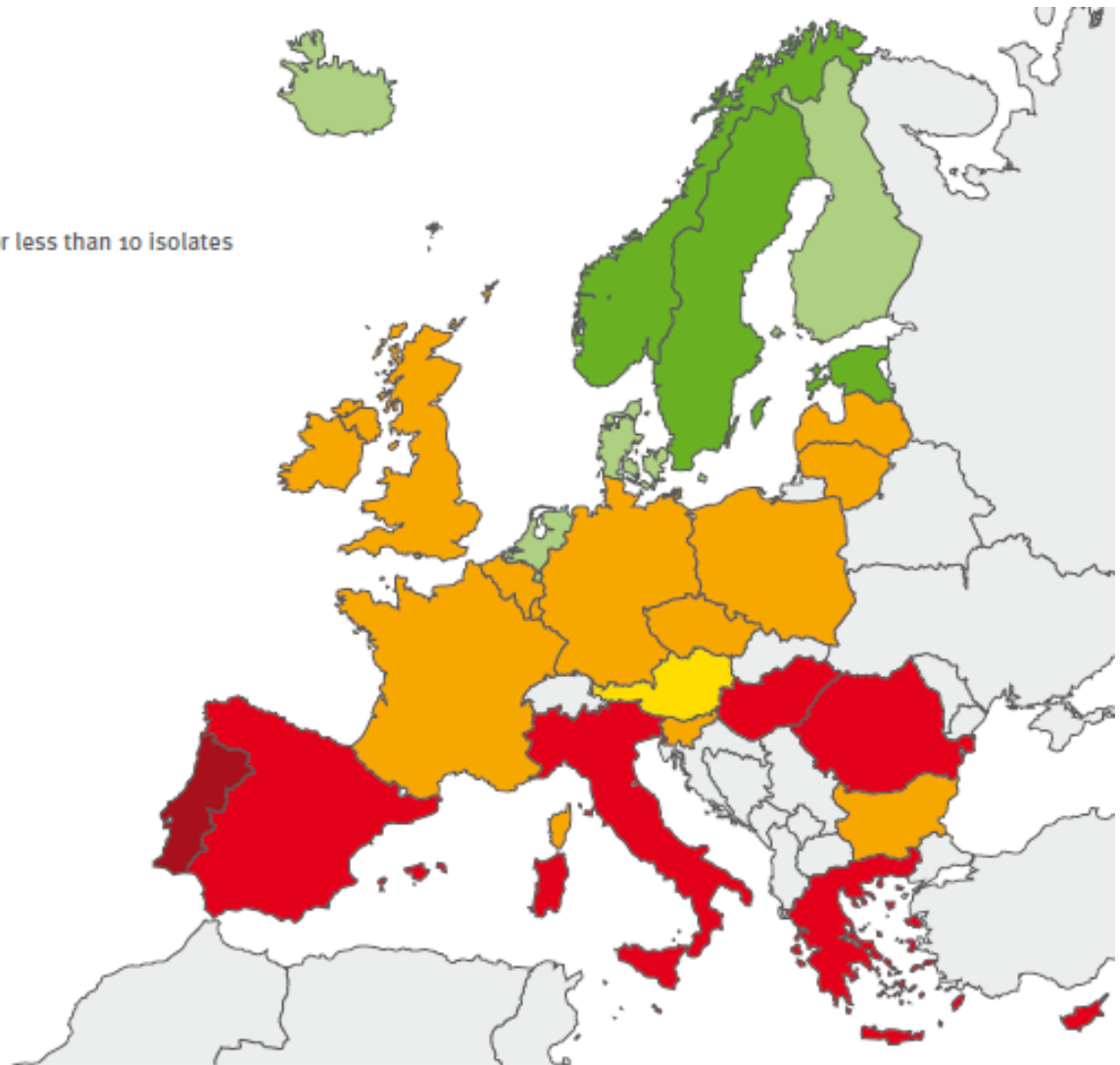
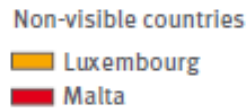
- bakteriémie a sepse

- katéetrové infekce krevního řečiště infekce a dalších implantátů - biofilm

Léčba

- U stafylokoků je lékem volby **oxacilin**, u močových infekcí cefalosporiny první generace
- **Makrolidy** jsou na místě jen u alergických osob.
- **Linkosamidy** mají význam u infekcí pohybové soustavy a opouzdřených procesů.
- Glykopeptidová antibiotika (**vankomycin** a teikoplanin) jsou v rezervě. Používají se u kmenů rezistentních na oxacilin, takzvaných MRSA.
- Meticilin rezistentní stafylokoky (MRSA) jsou epidemiologicky závažné kmeny, rezistence k β -laktamovým ATB.

MRSA 2010



Diferenciální diagnostika

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 stafylokoků

Plasmakoaguláza volná je pozitivní u zlatého stafylokoka, negativní u koaguláza negativních, proto se tak také označují

Clumping factor neboli vázaná plasmakoaguláza se používá stejně, ale je méně spolehlivá

Hyaluronidáza je nejen spolehlivá, ale i levná

Méně spolehlivé testy (nejsou důkazem)

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

Dourčení koaguláza negativních stafylokoků

V méně závažných klinických případech se spokojíme s tím, že jde o koaguláza negativního stafylokoka a netrváme na druhovém určení

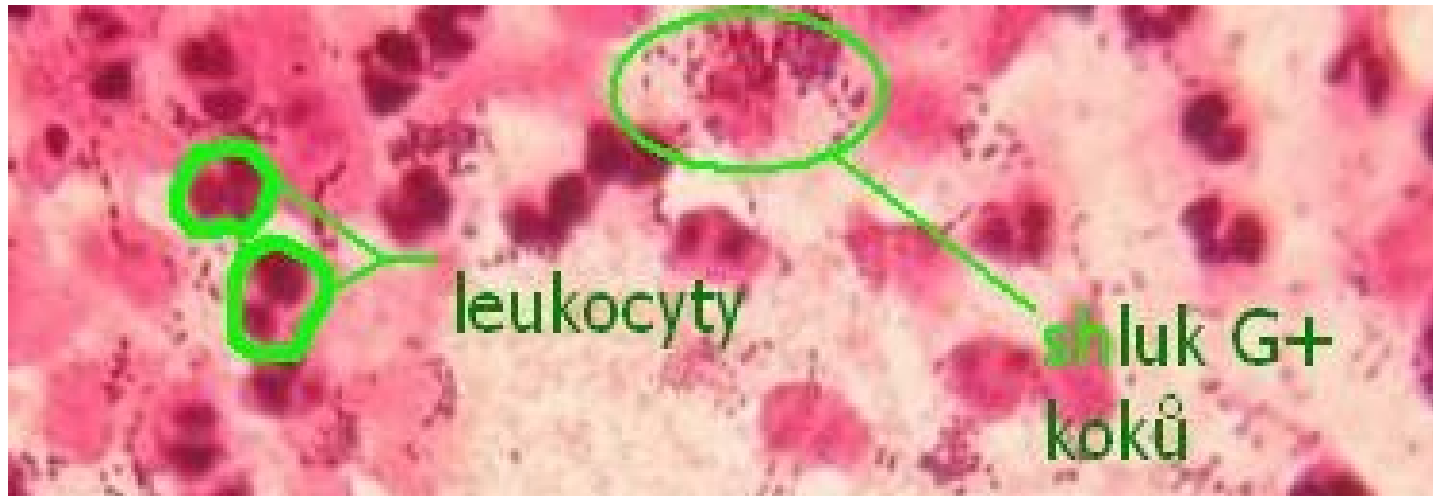
Pokud je druhové určení potřeba (např. u hemokultur), lze je provést biochemicky

V našich podmínkách se používá např. STAPHYtest 16 (Erba-Lachema)

Úkol 1: mikroskopie 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

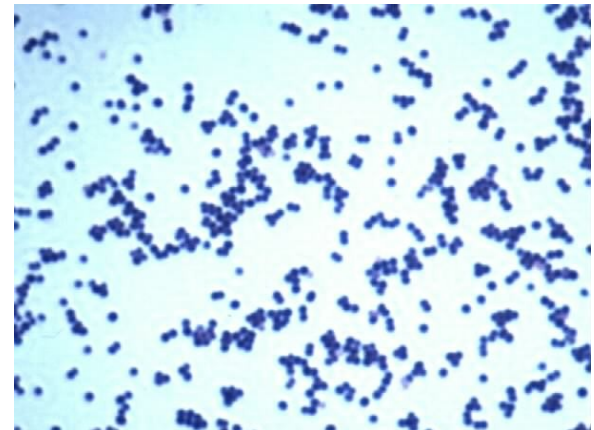


Úkol 2: barvení kultur podle Grama

Obarvěte podle Grama předložené kmeny (K, L, M, N)

(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.)

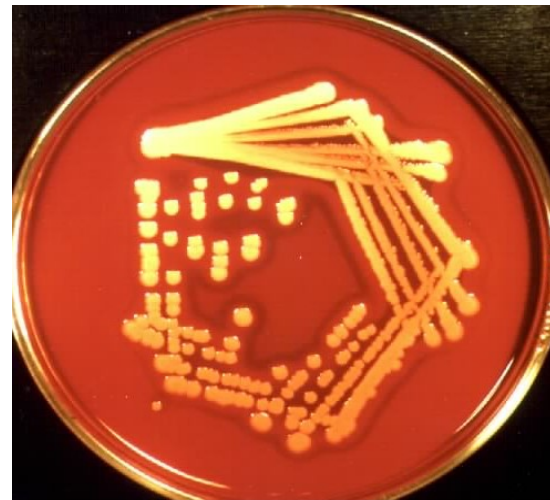
Imerzní olej + imerzní objektiv!!



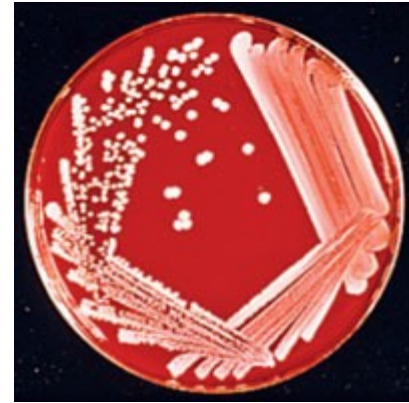
Úkol 3: popis kolonií na KA

Pečlivě si prohlédněte předložené kmeny

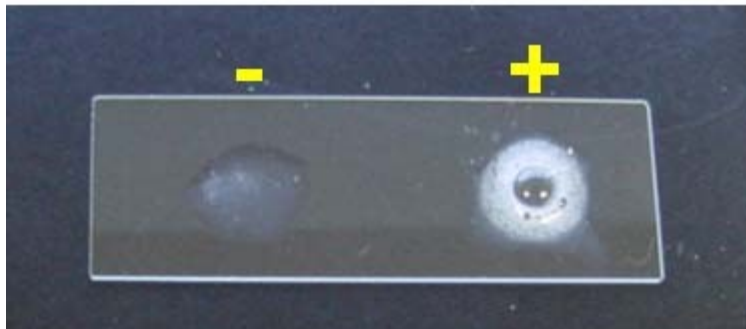
Popište všechny vlastnosti kolonií a zvláště si všimněte těch vlastností, které odlišují stafylokoky od ostatních grampozitivních koků (výrazný pigment, konzistence)



V úkolu 4 identifikujeme stafylokoka tím, že roste na KA s 10 % NaCl, kdežto ostatní nikoli



Úkol 5 katalázový test (kolonie vmícháme do kapky peroxidu vodíku). Pokud šumí, je to stafylokok



Pozor! Pozitivní katalázu má spousta bakterií, vč. G- tyček a koků

Úkol 6a - vázaná koaguláza

komerční testy

jsou spolehlivější než
volná
plasmakoaguláza

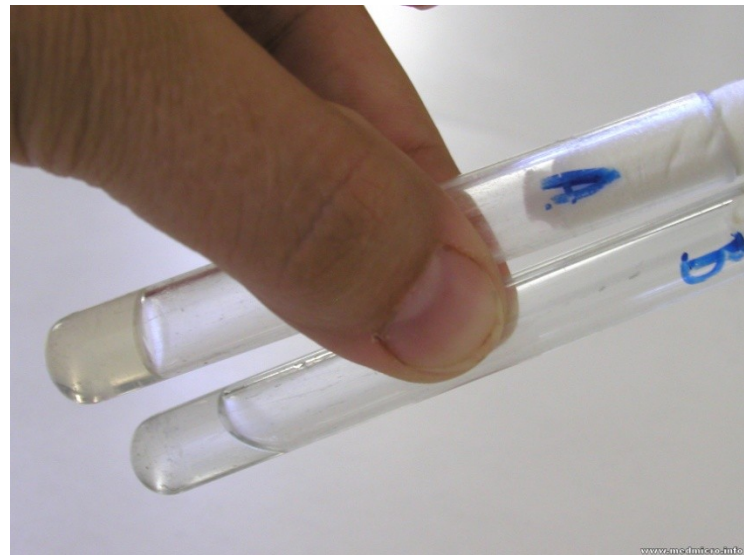


Úkol 6b – volná koaguláza

Nejklasičtější z testů pro odlišení zlatého stafylokoka

Klíčkou nabrané kolonie vmícháme do králičí plasmy ve zkumavce

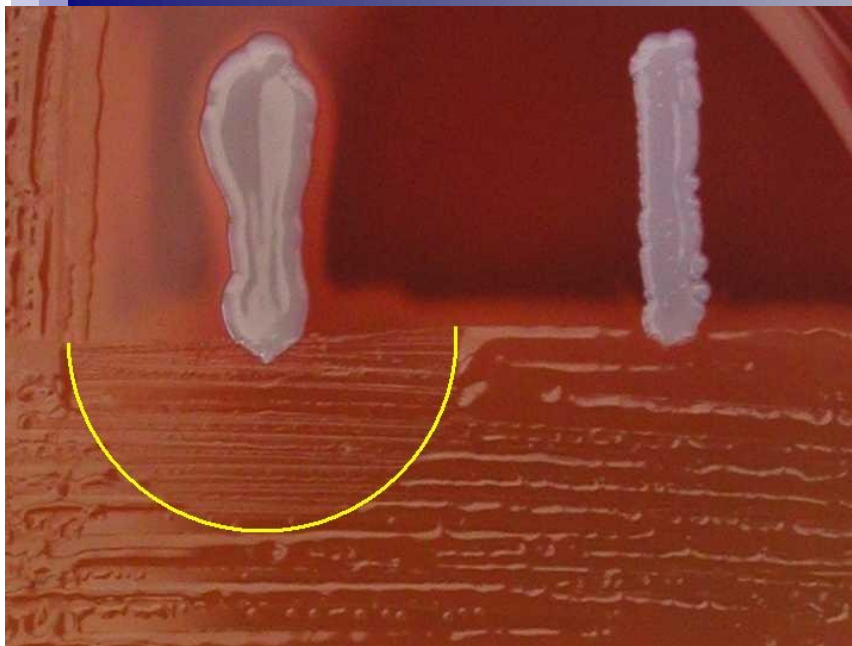
Pokud plasma zkoaguluje (má konzistenci želé), je koaguláza pozitivní



Úkol 6c: Hyaluronidáza (test dekapsulace)

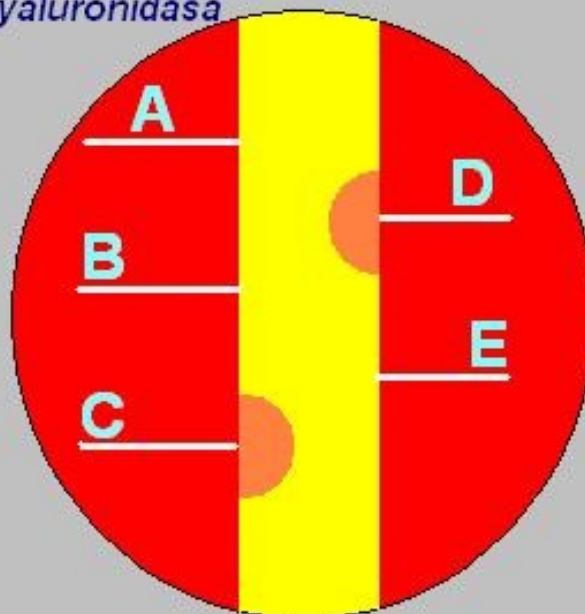
Princip testu: hyaluronidáza, produkovaná zlatým stafylokokem (ne však koaguláza negativními stafylokoky) rozpouští pouzdro bakterií tvořené k. hyaluronovou (*Streptococcus equii*)

Ztráta pouzdra se projeví změnou vzhledu streptokoka (ztráta „hlenovitosti“)



Hyaluronidáza

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

Úkol 7: rozlišení stafylokoků

STAPHYtest 16 – jak ho odečíst

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

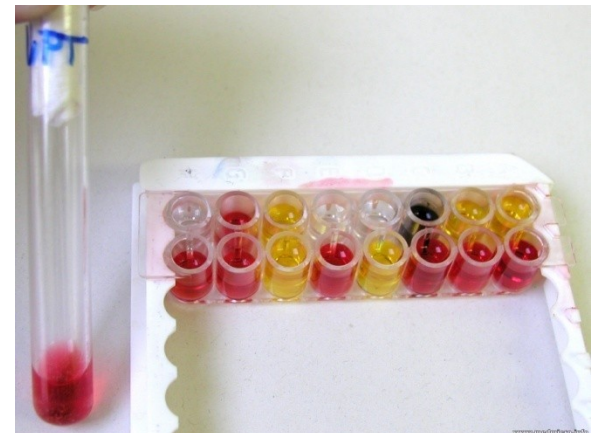
Druhý řádek STAPHYtestu = 10. – 17. reakce

Vypočítejte kód a porovnejte s

Kódovníkem. Kód je šestimístný.

Prvních pět číslic je z trojic testů,

šestá číslice je z dvojice



Vyhodnocení destičkových testů

- Z takového testu dostaneme řadu výsledků – většinou ve tvaru „+“ (test pozitivní, substrát štěpen, došlo ke změně) nebo „-“ (test negativní, substrát nebyl štěpen, zbarvení zůstalo původní).
- Příklad: + - + + + - - - - - - - - - + + + +
- Je několik způsobů, jak takovou řadu převést na „čitelný výsledek“:
 - **Porovnání s tabulkou** je možné jen u jednoduchých testů a jasných výsledků.
 - Přepočítání na **oktalové kódy** plus vyhledání výsledku v seznamu kódů. Nejběžněji používáno
 - Výsledek se zadá **do počítače**, který „vyplivne“ vyhodnocení. Ne vždy praktické

Oktalové kódy

- V praxi se každé trojici výsledků přiřadí číslice od nuly po sedmičku – viz následující obrazovka
- Zaznamenají se pozitivní a negativní výsledky reakcí
- Pod každou trojici se napíše 1 – 2 – 4
- Sečtou se pro každou trojici pouze číslice u „+“, nikoli u „–“ (ty se přeškrtnou)

Test	JAN	LEN	MAG	TOM	PET	KAR	FRA	HAN
Výsl.	+	–	+	+	+	–	–	–
	1	2	4	1	2	4	1	2
Kód	5			3			0	

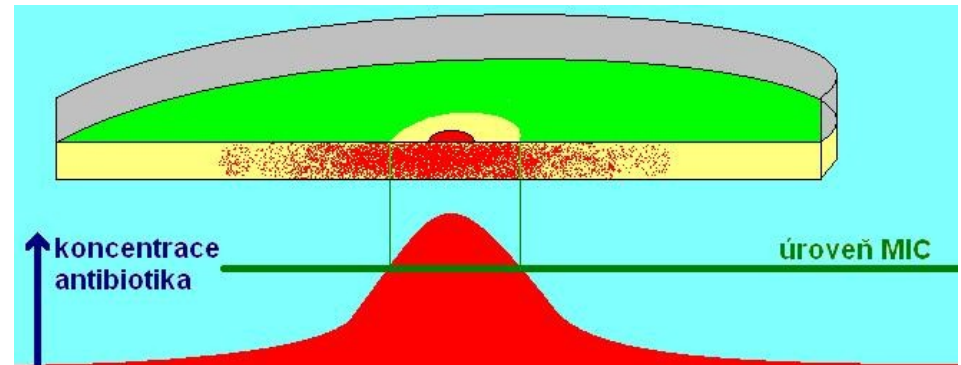
Druhý kmen

(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	
	Zkum	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		

Úkol 8: citlivost k antibiotikům

- Odečtete difusní diskový test – změřte zóny a porovnejte s referenčními zónami
- Všimněte si, že *S. aureus* je relativně citlivější než koaguláza negativní stafylokoky.



Odečtení testu citlivosti

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Oxacilin (protistaf. penic.)	OX	13 mm
Cefalotin (cefalosp. 1. g.)	KF	18 mm
Vankomycin	VA	12 mm
Klindamycin (linkosamid)	DA	21 mm
Rifampicin	RF	20 mm
Gentamicin	GN	15 mm