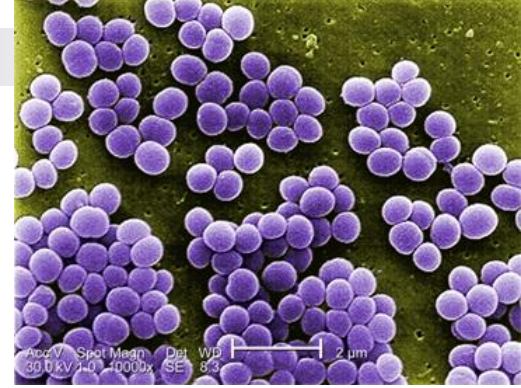


P01

Stafylokoky

Rod *Staphylococcus*



- Grampozitivní koky, nejčastěji ve shlucích tvaru hroznů
- Nepohyblivé a nesporující
- Velmi odolné (vyschnutí, vyšší koncentrace solí - 10 % NaCl)

Rozdělení podle koagulace plazmy na

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

Staphylococcus aureus

(zlatý stafylokok)

Jediný pro člověka běžně významný z tzv.
koaguláza pozitivních stafylokoků
Výrazná beta- hemolýza



Virulenční faktory *S. aureus*

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 průjmy

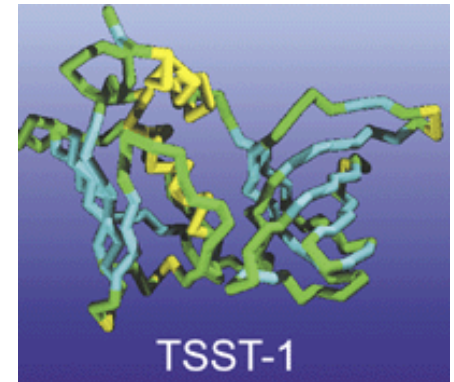
hyaluronidáza – enzym, který produkují stafylokoky a usnadňuje invazivitu

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

Toxiny

Některé kmeny produkují enterotoxiny - enterotoxikóza (intoxikace bakteriálním toxinem se projeví velice rychle, obvykle také rychle odezní)

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



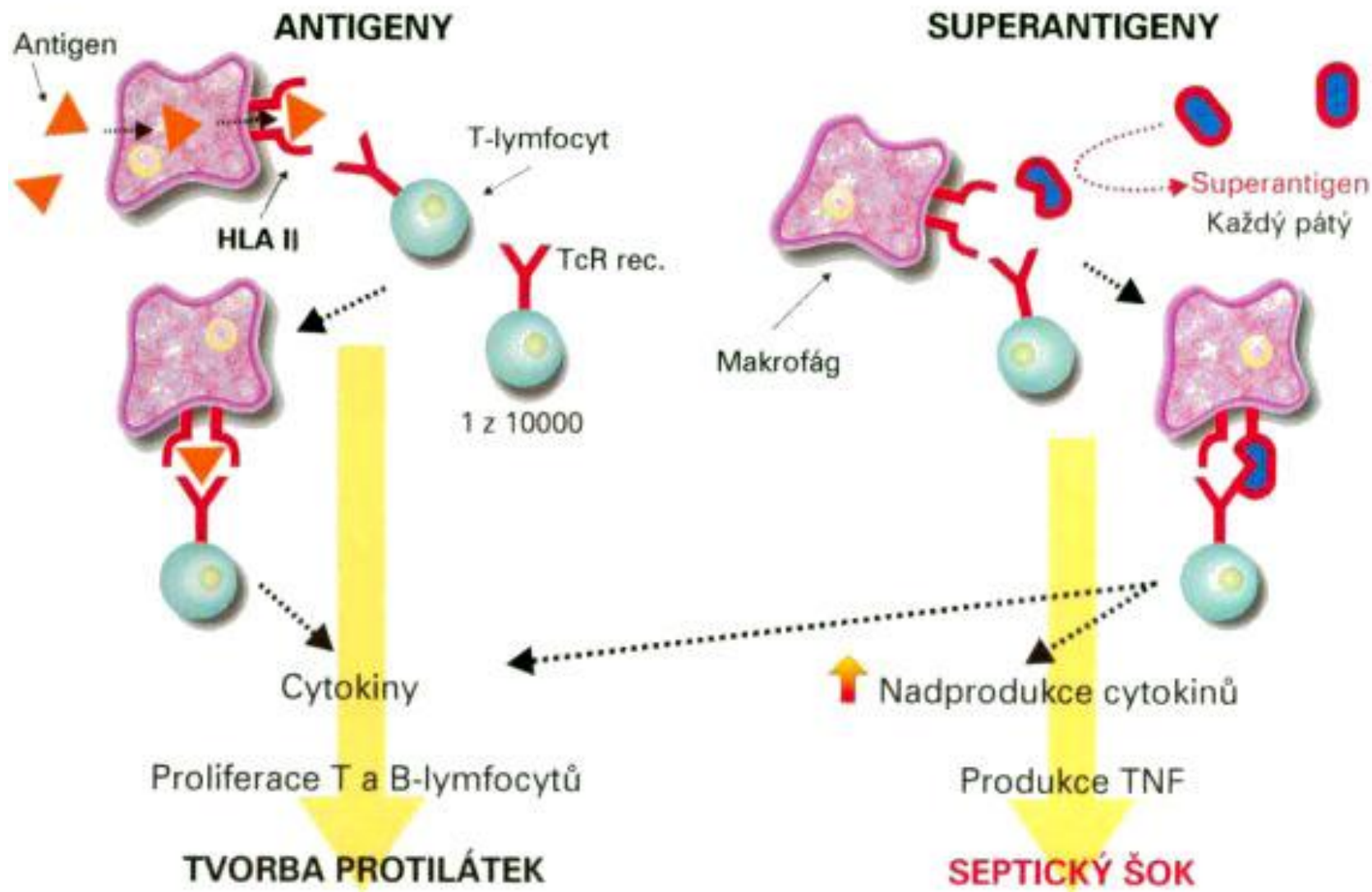
Exfoliativní toxiny (epidermolyziny)
- stafylokokový syndrom opařené kůže



Superantigeny

www.zuova.cz/informace/hrlpab16.php

Imunitní odpověď



Patogeneze

- Hnisavá onemocnění
- Toxické případy
- Otravy z potravin

- Predispozice: poranění, cizí tělesa, DM, imunodeficity, virové infekce aj.

Abscesy

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

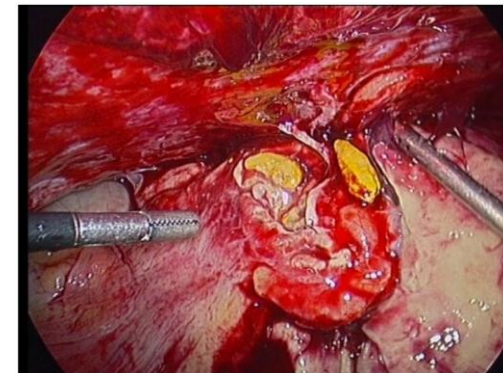
Onemocnění způsobené *S. aureus*

- Nejčastěji infekce kůže a kožních adnex (pyodermie)- impetigo, folikulitida, ječné zrno aj.
- infekce močových cest
- infekce dýchacích cest, pneumonie (sekundární)
- bakteriémie a sepse
- katéetrové infekce krevního řečiště infekce a dalších implantátů - biofilm

➤ hnisavé infekce ran



➤ hnisavé infekce měkkých tkání - abscesy



➤ hnisavé infekce tvrdých tkání - osteomyelitis



Koaguláza negativní stafylokoky

- Nejběžnější je ***Staphylococcus epidermidis*** (30 – 90 % izolátů)
- Další, klinicky významní: *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. sciuri*, *S. capitis*, aj.
- Jsou součástí normální mikroflóry, zejména kůže
- V poslední době jsou velice významnými původci infekcí u oslabených osob
- Způsobují: - infekce močových cest (*S. saprophyticus*)
 - bakteriémie a sepse
 - katéetrové infekce krevního řečiště infekce a dalších implantátů - biofilm

Léčba

- U stafylokoků je lékem volby **oxacilin**
- **Makrolidy** 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.

MRSA a jejich detekce

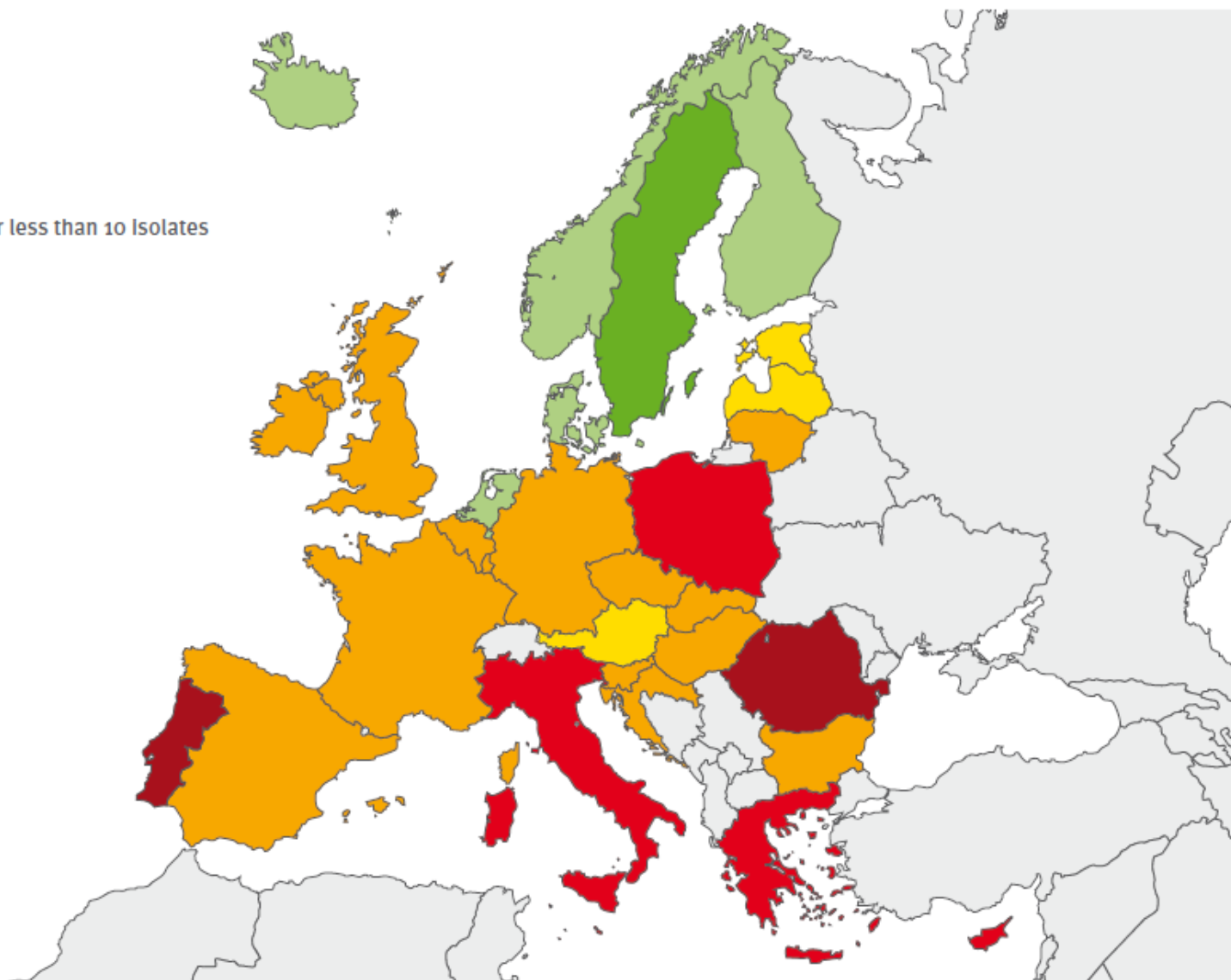
- **meticilin rezistentní stafylokoky** (MRSA) jsou epidemiologicky závažné kmeny, často způsobující nozokomiální infekce
- příčinou je změna tzv. penicilin binding proteins (PBP)
- na problém upozorní malá zóna u oxacilinu (ta však může být způsobena i jinými vlivy)
- za průkazné se považuje, je-li malá zóna nejen u oxacilinu, ale i u cefoxitinu

Figure 3.43. *Staphylococcus aureus*. Percentage (%) of invasive isolates resistant to meticillin (MRSA), by country, EU/EEA countries, 2012

- < 1%
- 1% to < 5%
- 5% to < 10%
- 10% to < 25%
- 25% to < 50%
- ≥ 50%
- No data reported or less than 10 Isolates
- Not Included

Non-visible countries

- Liechtenstein
- Luxembourg
- Malta



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

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

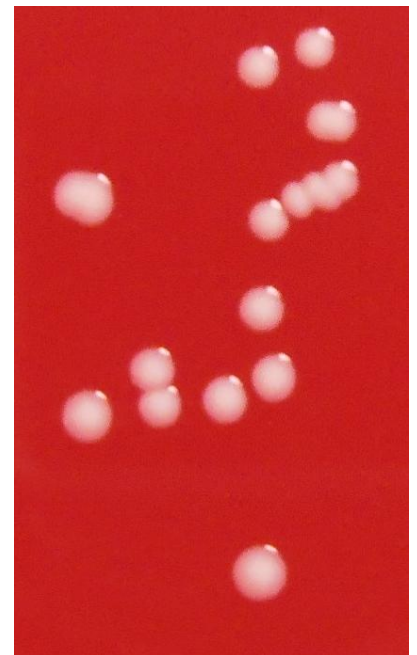
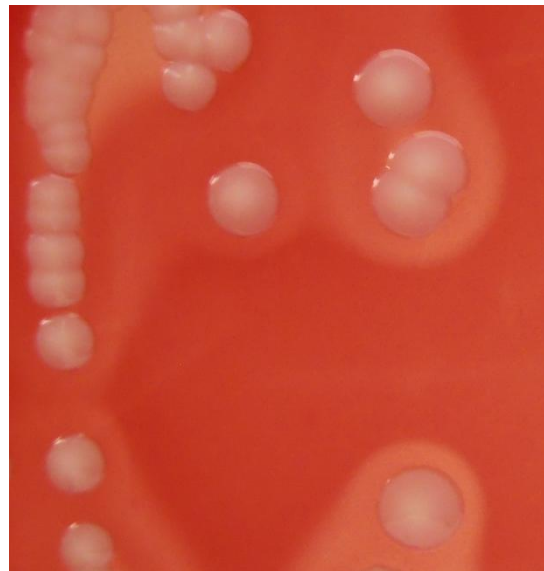
Hyaluronidáza

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 zbarvení 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

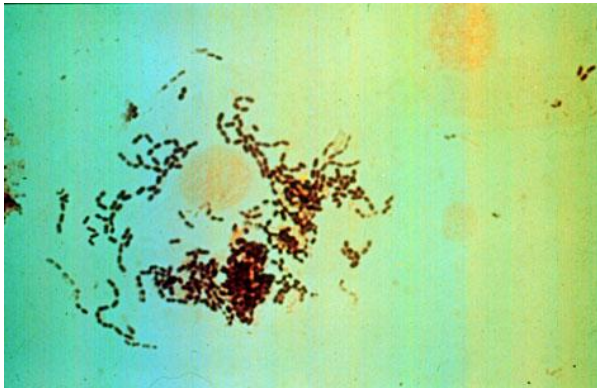
Pokud je druhové určení potřeba (např. u hemokultur), lze je provést biochemicky

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

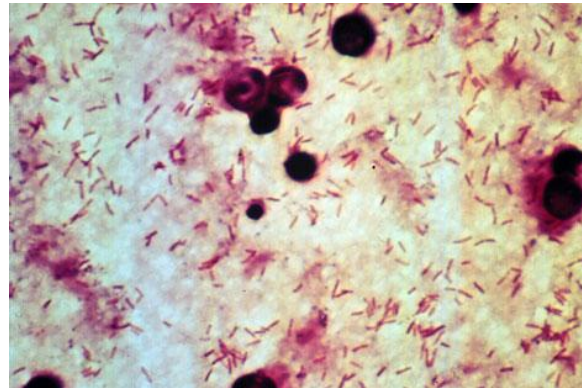
Úkol 1: mikroskopie vzorku

Prohlédněte si mikroskopický preparát sputa, obarvený podle Grama

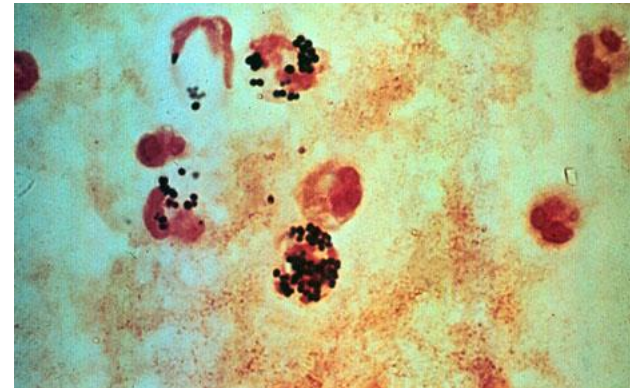
Pátrejte po **grampozitivních kóciích ve shlucích** a také po **leukocytech** (hlavně polymorfonukleárech), které svědčí pro bakteriální zánět



1



2



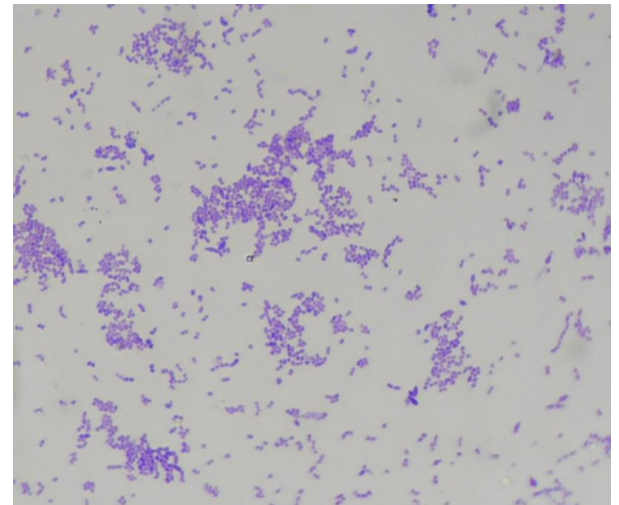
3

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

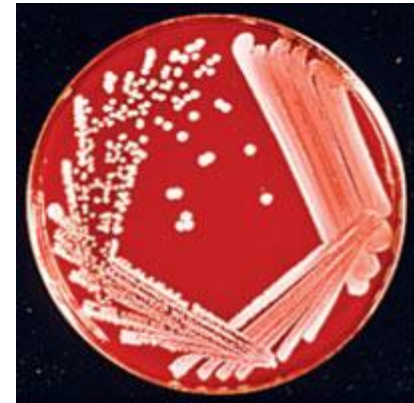
Pečlivě si prohlédněte předložené kmeny

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

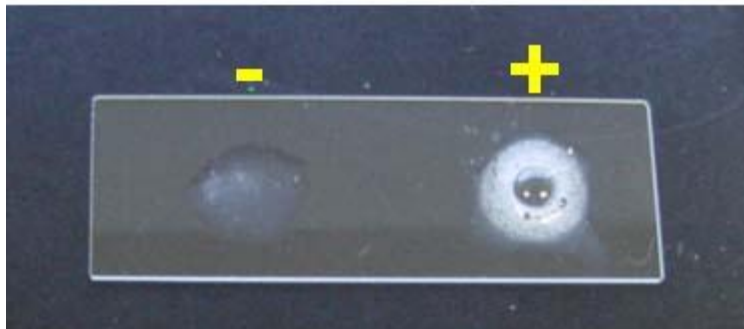
ZNAKY POPISOVANÉ NA BAKTERIÁLNÍ KOLONII

Velikost	hodnotí se jen u dobře izolovaných kolonií, uvádí se v mm
Tvar	kolonie pravidelná kulatá, oválná, nepravidelně laločnatá, plazící se
Profil	kolonie plochá, vypouklá, misko vitá, s vystupujícím středem, s navalitymi okraji apod.
Okraje	rovné, nebo vláknité, s výběžky, lalůčky atd.
Povrch	hladký, lesklý (S-fáze), matný, drsný (R-fáze), krabatý
Transparence	kolonie průhledná, průsvitná, neprůsvitná
Barva	kolonie bezbarvá, nebo pigmentovaná: nasedla, bělavá, žlutá, s černým středem apod.
Změny v okolí	dvorec zbarvení, hemolýzy, precipitátu
Konzistence	kolonie mazlavá, drobivá, hlenovitá, vrůstá do agaru apod.
Zápach	po jasmínu, spermatu, žluklém másle, ovocný, nakyslý atd.

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

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 obrázek 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



Úkol 6b – volná koaguláza

Klíčkou nabrané kolonie vmícháme do králičí plasmy
ve zkumavce

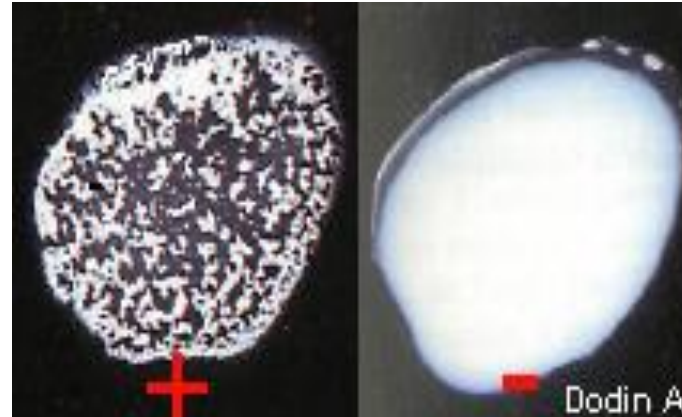
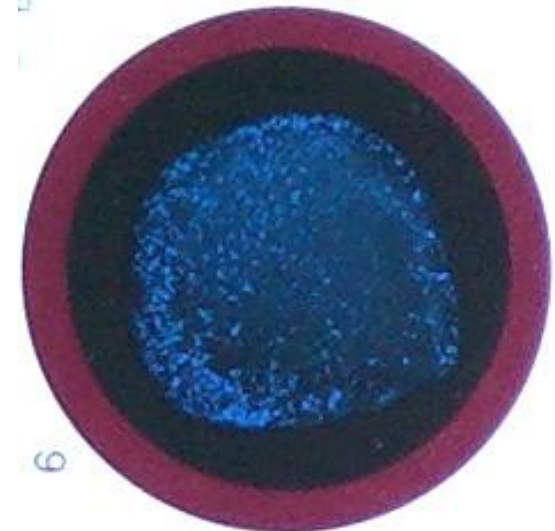
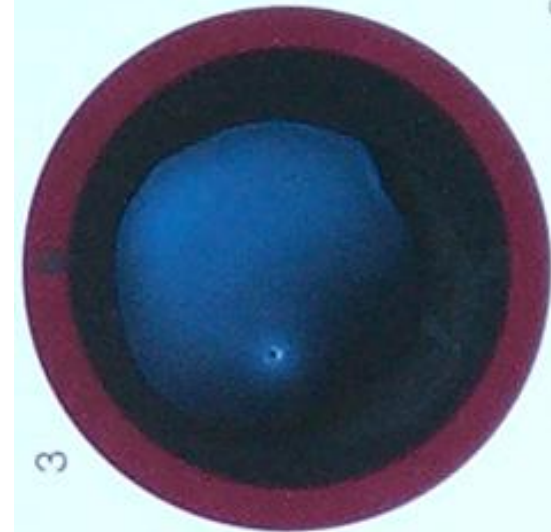
Pokud plasma zkoaguluje (má konzistenci želé), je
koaguláza pozitivní



Souprava Staphaurex a výsledky

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

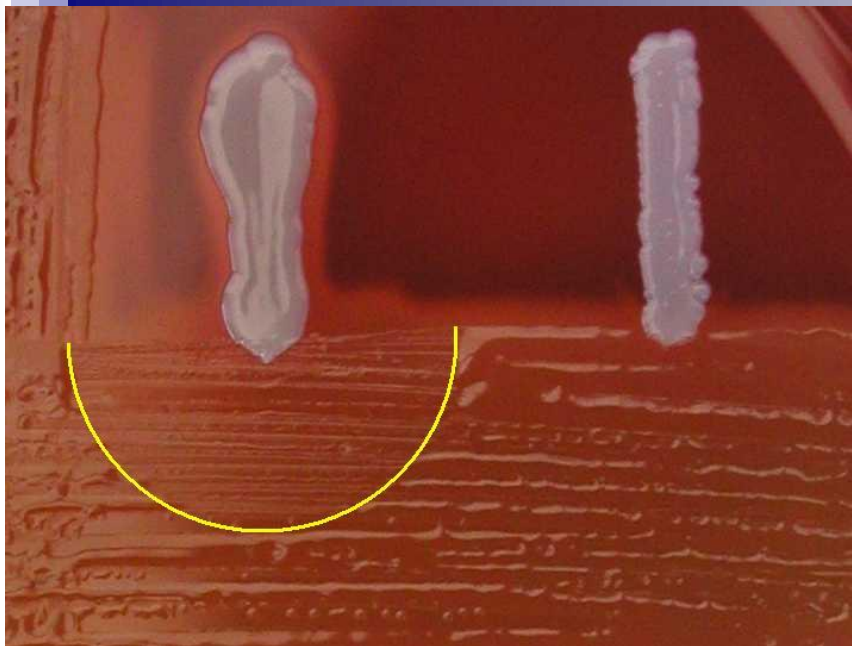
www.microbes-edu.org



Úkol 6c: Hyaluronidáza (test dekapsulace)

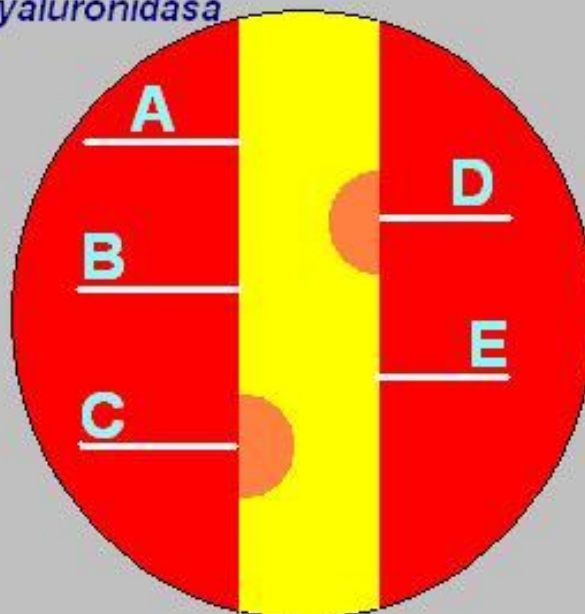
Princip testu: hyaluronidáza, produkovaná zlatým stafylokokem (ne však koaguláza negativními stafylokoky) rozpouští pouzdro bakterií tvořené kyselinou hyaluronovou (*Streptococcus equi*)

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

Co tedy musíte prakticky provést

- V úkolu 6 a) provedete clumping faktorový test, když kolonie vmícháte do kapky plasmy
- V úkolu 6 b) si prohlédnete 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 6 c) si prohlédnete včera připravený hyaluronidázový test. Pozitivní je kmen, který „rozpouští slizovitost“ pásu streptokoka

Úkol 7: rozlišení stafylokoků

STAPHYtest 16 – jak ho odečíst

STAPHYtest 16, zahrnuje ve skutečnosti 17 reakcí.

Jako první se odečítá test VPT ve zkumavce.

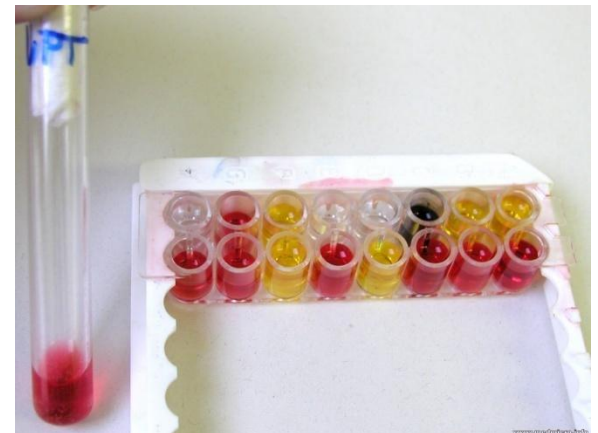
Červená tekutina ve zkumavce = pozitivní VPT,
bezbarvá tekutina = negativní

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



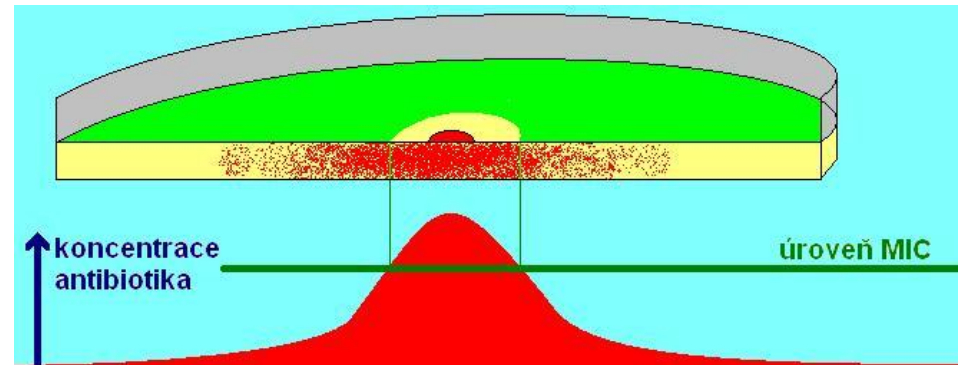
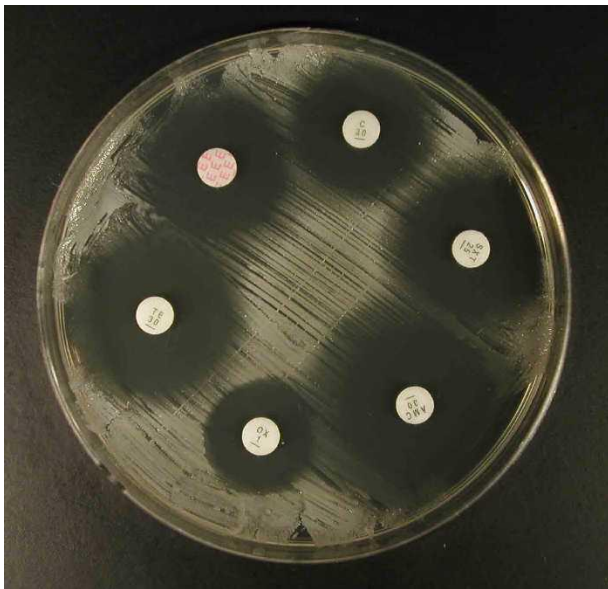
Oktalové kódy

- 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	

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.

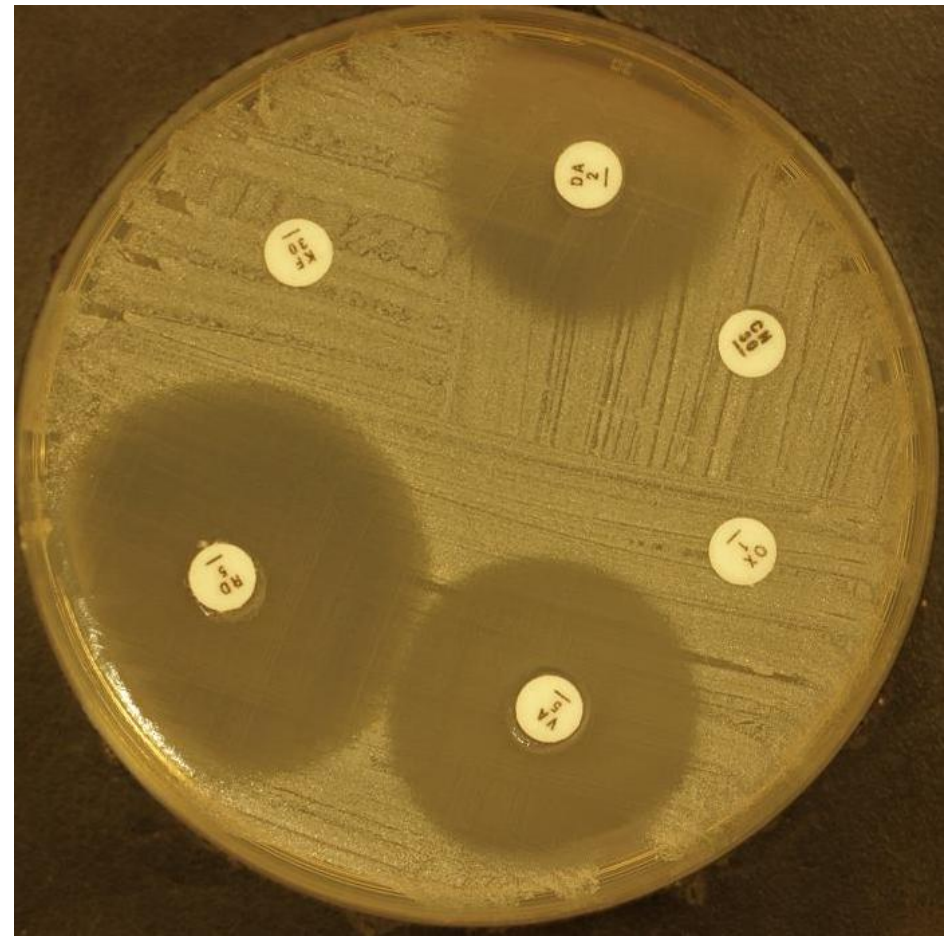
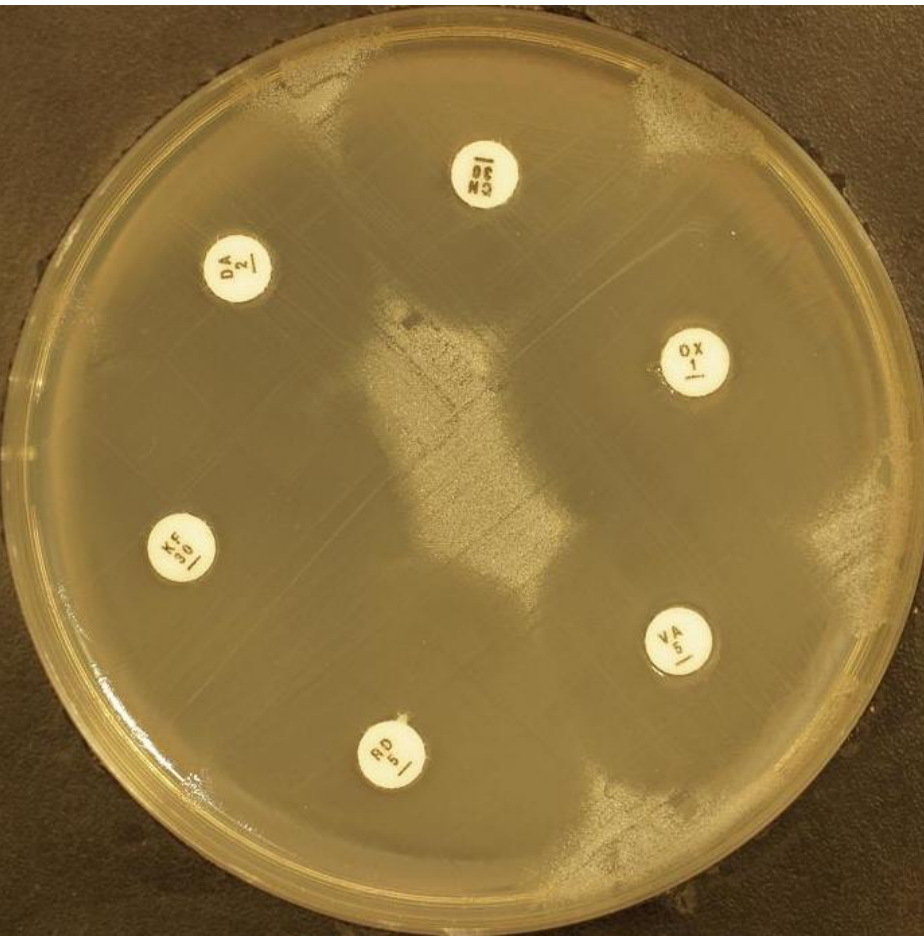


Odečtení testu citlivosti

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Cefoxitin (cefamycin)*	FOX	22/25 mm**
Klindamycin (linkosamid)	DA	21 mm
Erythromycin (makrolid)	E	22 mm
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	18 mm
Tetracyklin (tetracyklin)***	TE	22 mm
Chloramfenikol (amfenikol)	C	18 mm

*výsledek platí i pro oxacilin a další betalaktamy **22 mm *S. aureus*,
25 mm koaguláza negativní stafylokok *** platí i pro doxycyklin

Test citlivosti u zlatého a koagulázanegativního stafylokoka



Úkol č 8b - MRSA

- Máte několik kmenů na speciální screeningové půdě pro MRSA (opakování z jarního semestru)
- **Modré kolonie** jsou kolonie kmenů MRSA
- Růžové či bílé kolonie jsou methicilin rezistentní kolonie jiných stafylokoků, než je *S. aureus*
- Žádné kolonie - jde o methicilin-citlivý kmen