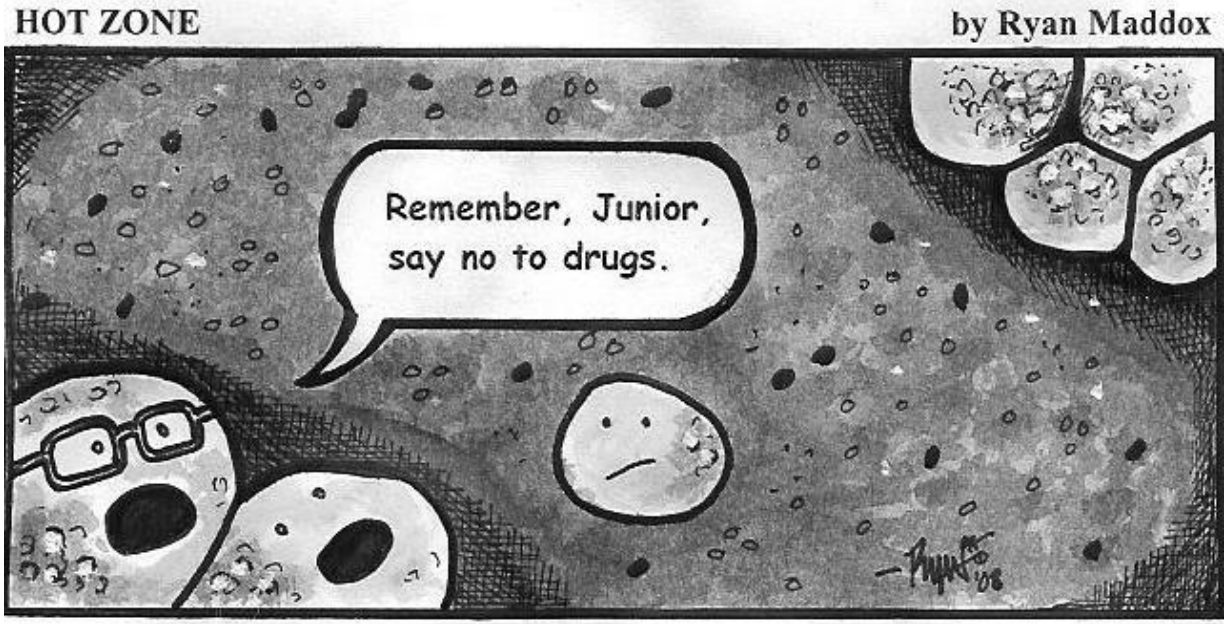


STAFYLOKOKY
praktikum č. 1

Lékařská mikrobiologie – cvičení
Mikrobiologický ústav LF MU

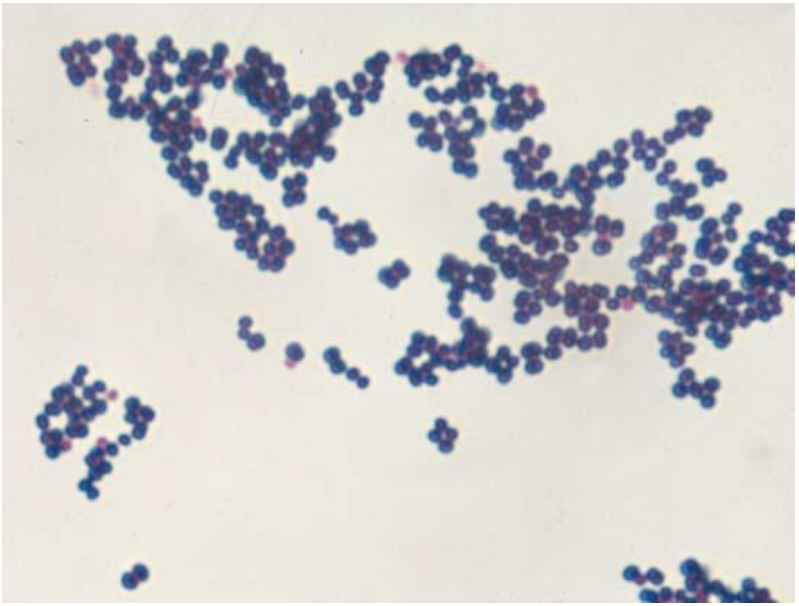
Před tímto cvičení byste měli umět:

- Práce s mikroskopem
- Gramovo barvení
- Zásady práce v mikrobiologické laboratoři

- Vyplněný odpovědník a vytištěný protokol (před každým cvičením)

Stafylokoky

- G+ koky, nesporulující, nepohyblivé, často ve shlucích ve tvaru hroznů (lat. *staphyle* – hrozen).



- Velmi odolné proti vyschnutí, vyšší koncentraci solí (diagnostický znak).

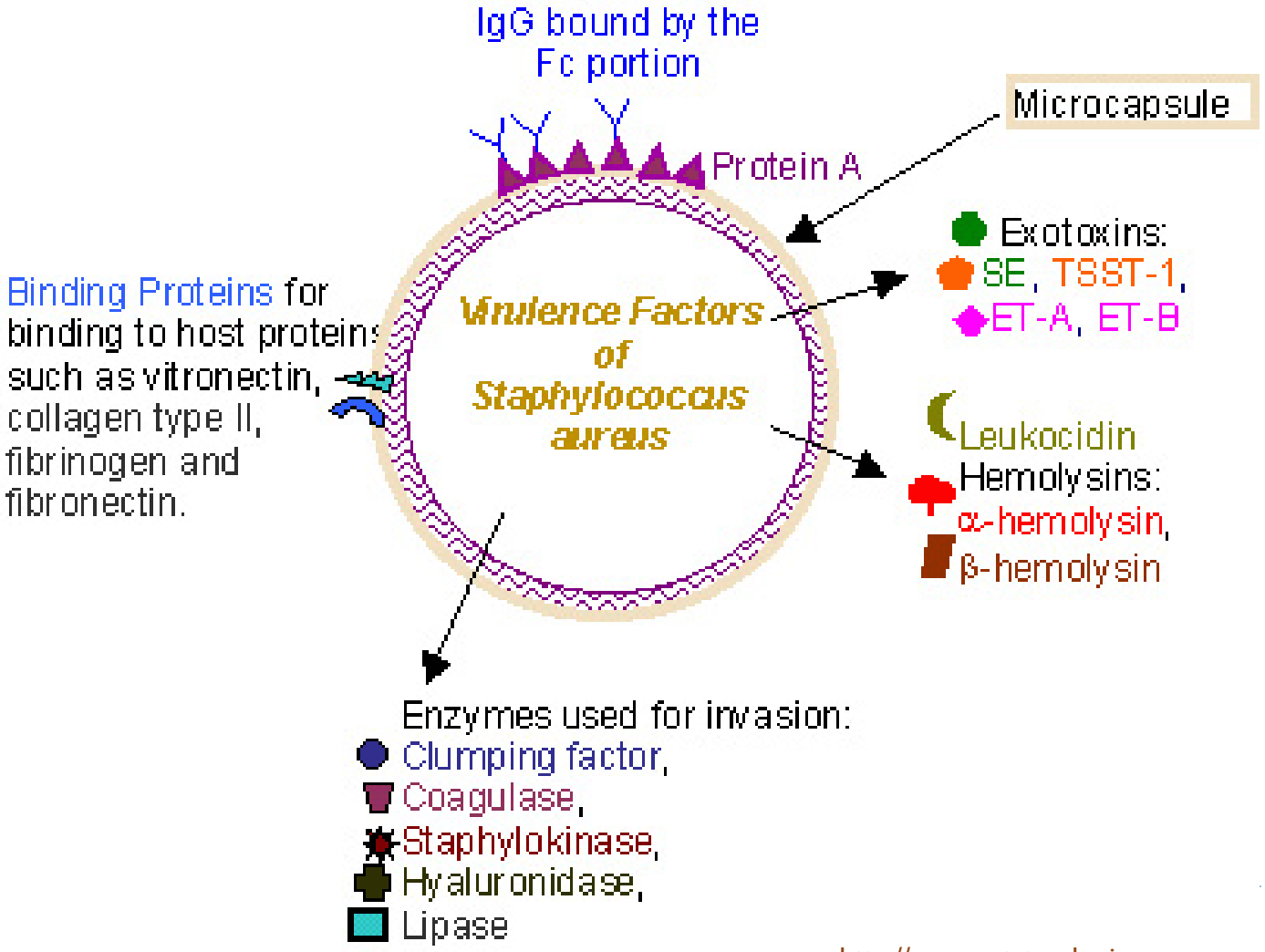
Dělení stafylokoků

- Rozdělení podle koagulace plazmy na:
  - koaguláza pozitivní (*S. aureus)*
  - koaguláza negativní (CoNS – *S. epidermidis*)

Staphylococcus aureus (zlatý stafylokok)

- Jediný pro člověka běžně významný z tzv. **koaguláza pozitivních stafylokoků.**
- Původce infekcí kůže, chlupů, nehtů, otitis externa, zánětů spojivek, infekcí DCD (i 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, nalézaných u *S. aureus*, je veliké množství…



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

http://www.ratsteachmicro.com

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 (hlavně *S. saprophyticus*), případně i infekcí ran, katétrových sepsí aj.
- Jejich nález se tedy hodnotí jinak např. ve výtěru v nosu či ve stolici, jinak v moči, a zcela jinak v hemokultuře.

Staphylococcus epidermidis

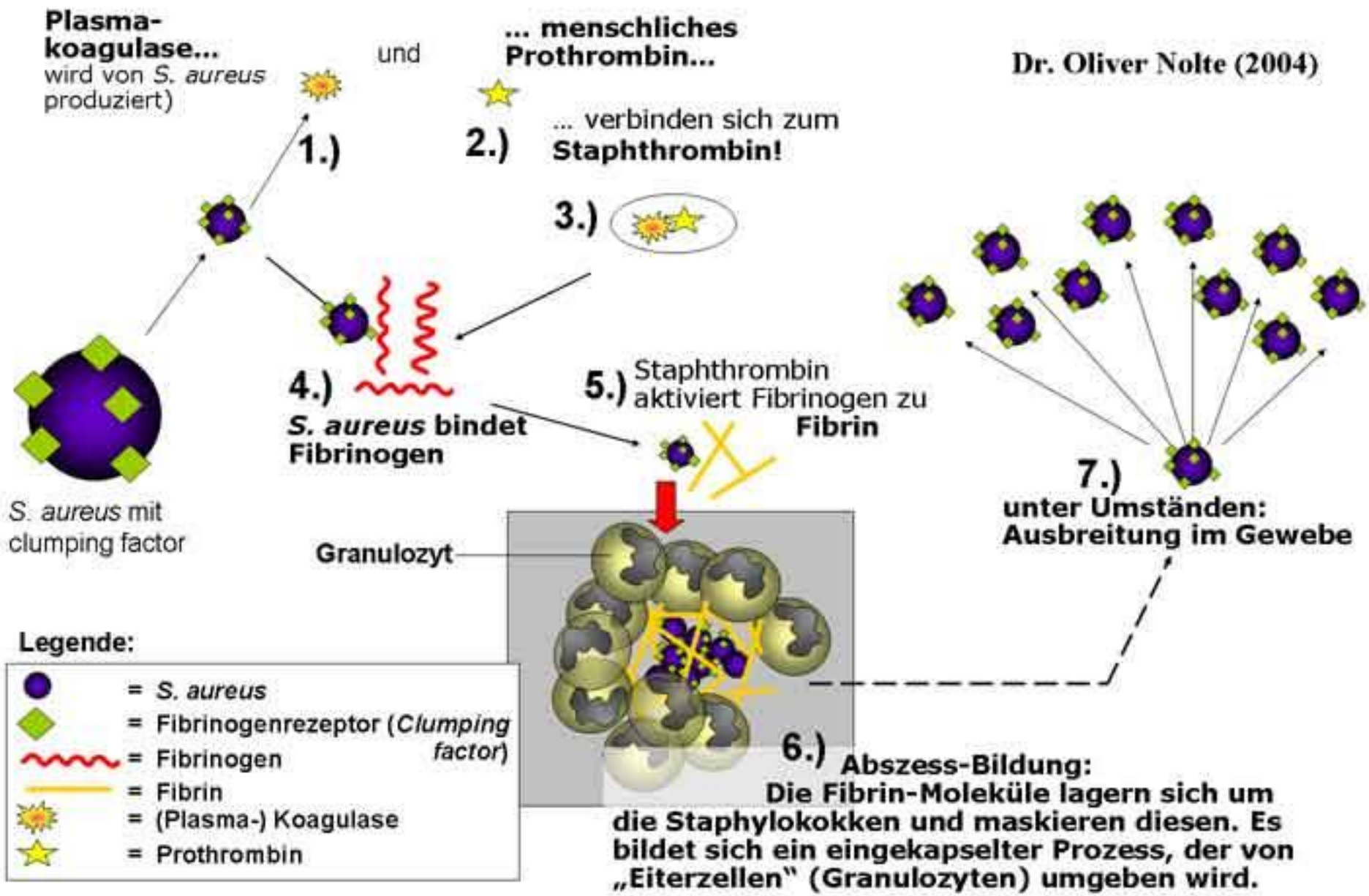
- *Staphylococcus epidermidis*, nejběžnější z takzvaných koaguláza negativních stafylokoků.
- Koaguláza negativní stafylokoky patří do stejného rodu jako zlatý stafylokok.
- Jsou mnohem méně patogenní než *S. aureus*
- V poslední době jsou však velice významnými původci infekcí u oslabených osob, zejména nemocničních.
- Na katétrech a jiných plastech často tvoří biofilm.

Klinický význam stafylokoků

- Hnisavé infekce kůže
- Hnisavé infekce ran
- Hnisavé infekce měkkých tkání - abscesy
- Hnisavé infekce tvrdých tkání
- Sepse
- Infekce močových cest – *S. saprophyticus*
- Intoxikace - stafylokoková enterotoxikóza
  - syndrom toxického šoku (TSST-1)

Abscesy

- Na rozdíl od streptokoků, které vytvářejí ve tkání zpravidla **neopouzdřené flegmóny**, tvoří stafylokoky spíše **opouzdřené abscesy**. Vznik abscesu (pomocí tzv. clumping faktoru a plasmakoagulázy – viz dále!) ukazuje následující schéma, převzaté z německých internetových stránek.



http://www.autovaccine.de/abscess_formation/Abszess_b.jpg

Příklady infekcí způsobených zlatým stafylokokem: Impetigo…

http://pathmicro.med.sc.edu/fox/staph-impetigo.jpg

…bulózní impetigo…

http://www.adhb.govt.nz/newborn/TeachingResources/Dermatology/BullousImpetigo/BullousImpetigo3.jpg

…otitis externa s furunklem…

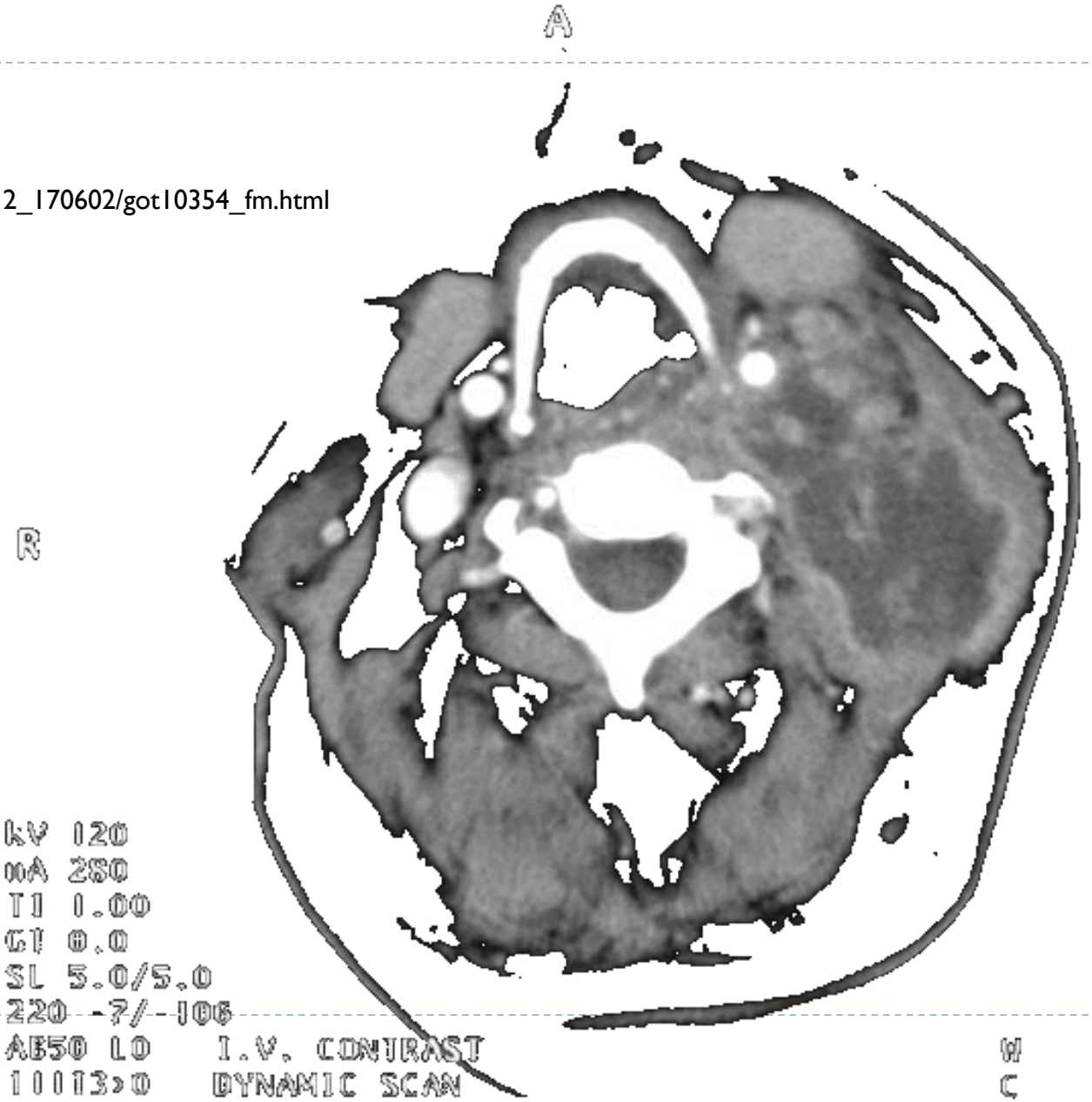
www.merck.com/mmpe/print/sec08/ch088/ch088c.html.

…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

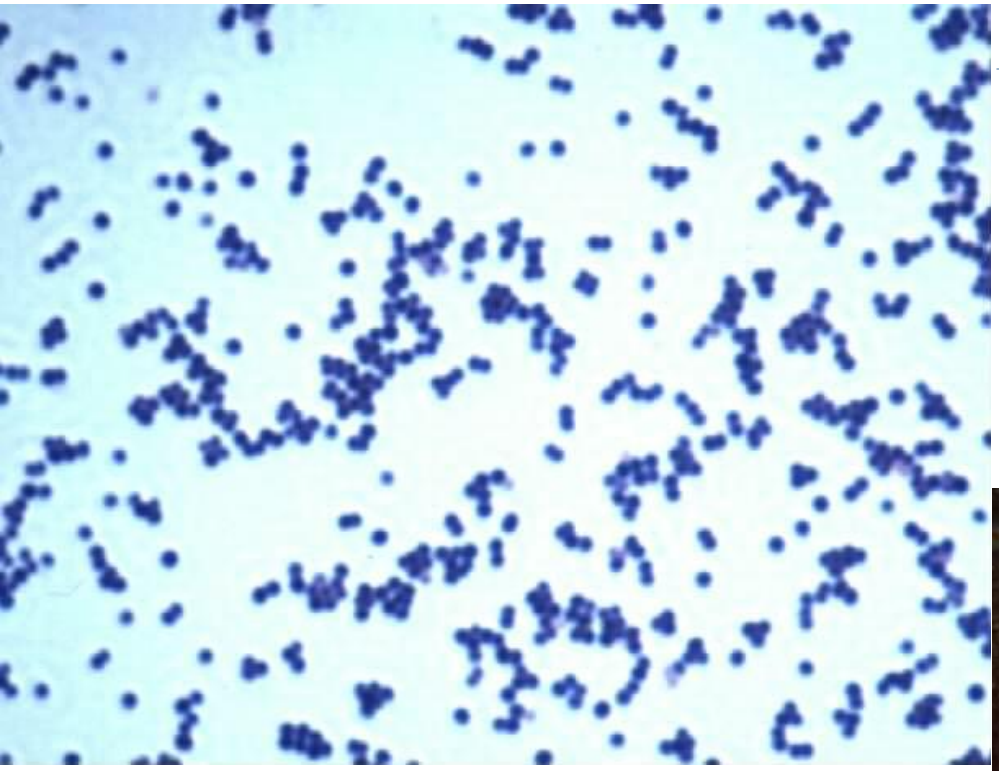


Diagnostika

- 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.

Diagnostika

1) Kultivace: na KA kolonie větší (2 mm), ploché, máslovité konzistence, bílé, anebo (hlavně u zlatého stafylokoka) nazlátlé
2) Mikroskopie: grampozitivní kok
3) Biochemické testy: kataláza pozitivní, oxidáza negativní, biochemicky lze rozlišit jednotlivé druhy
4) Testy na přítomnost koagulázy – *S. aureus* nebo CoNS
5) Komerčně dostupné testy – např. STAPHYtest 16



Autor: Prof. MVDr. Boris Skalka, DrSc.

Diferenciální diagnostika 1

- Gramovo barvení – rozliší grampozitivní a gramnegativní koky / tyčinky.
- Pozitivní kataláza - odliší stafylokoky od streptokoků a enterokoků. Oxidázu bychom případně využili k odlišení mikrokoků (v praxi výjimečně).
- Stejnou službu (a ve směsi mikrobů ještě lepší) udělá kultivace na KA s 10 % NaCl (6,5 % NaCl na kultivaci enterokoků).

Katalázový test (pro připomenutí) – H_2O_2

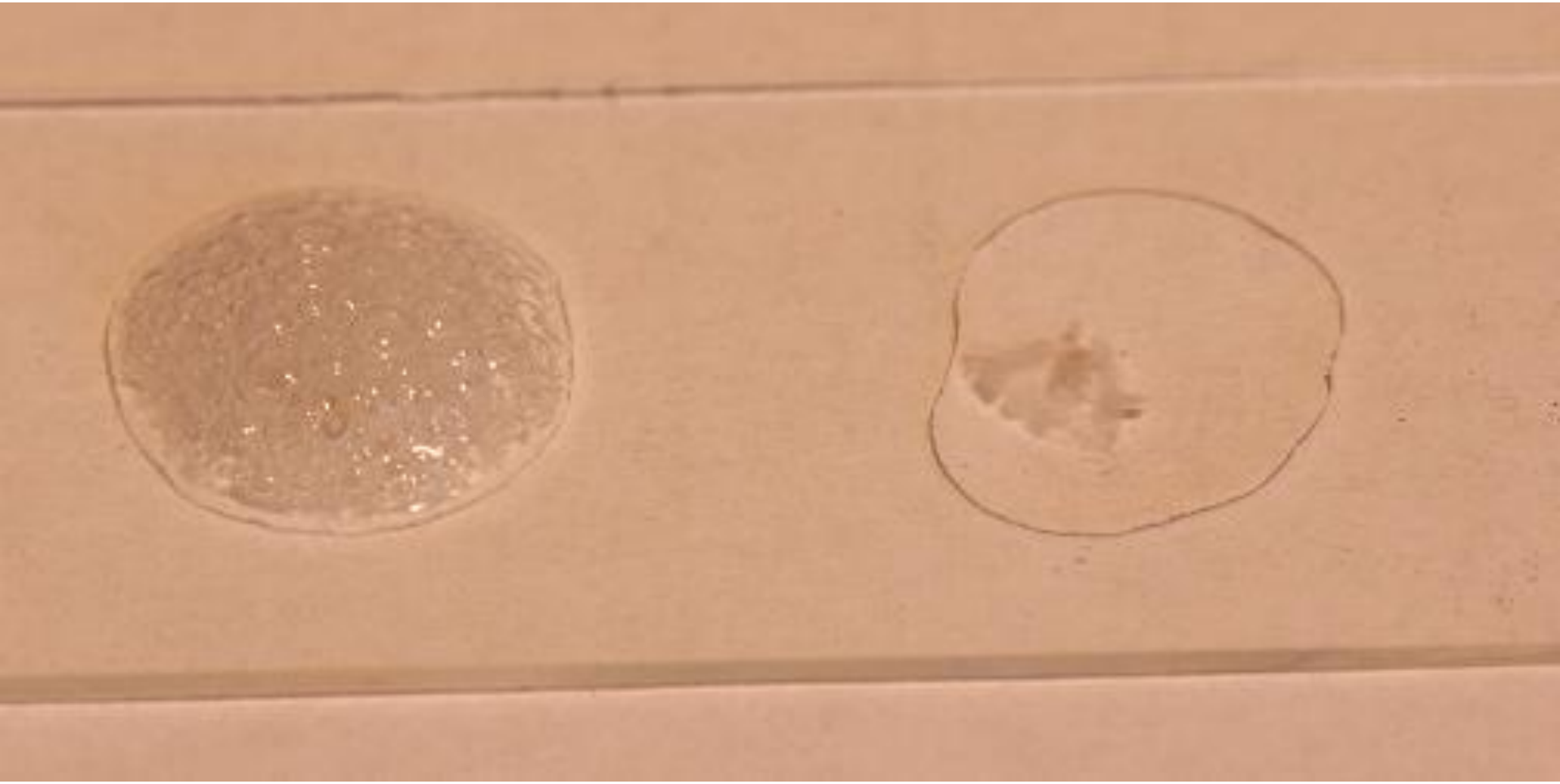


Photo: Veronika Holá

Diferenciální diagnostika 2

- **Plasmakoaguláza** je pozitivní u zlatého stafylokoka, negativní u koaguláza negativních. Konvertuje fibrinogen na fibrin (tvorba abscesů, typické shlukování buněk stafylokoků).
  - **Volná** – uvolňuje se do prostředí
  - **Vázaná (clumping factor)**
- Komerční testy na bázi antigenní analýzy jsou naopak velmi spolehlivé.
- **Hyaluronidáza** – hydrolyzuje kyselinu hyaluronovou, je nejen spolehlivá, ale i levná.

Méně spolehlivé testy

- 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.

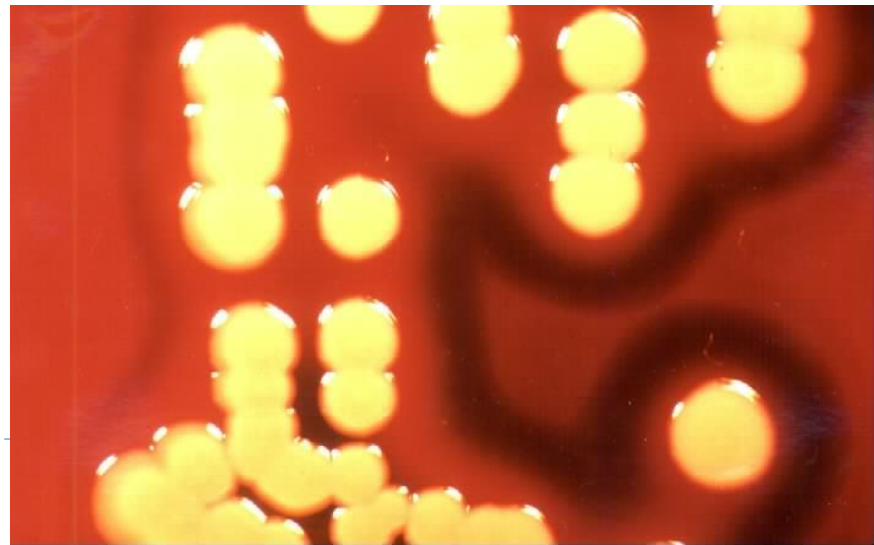
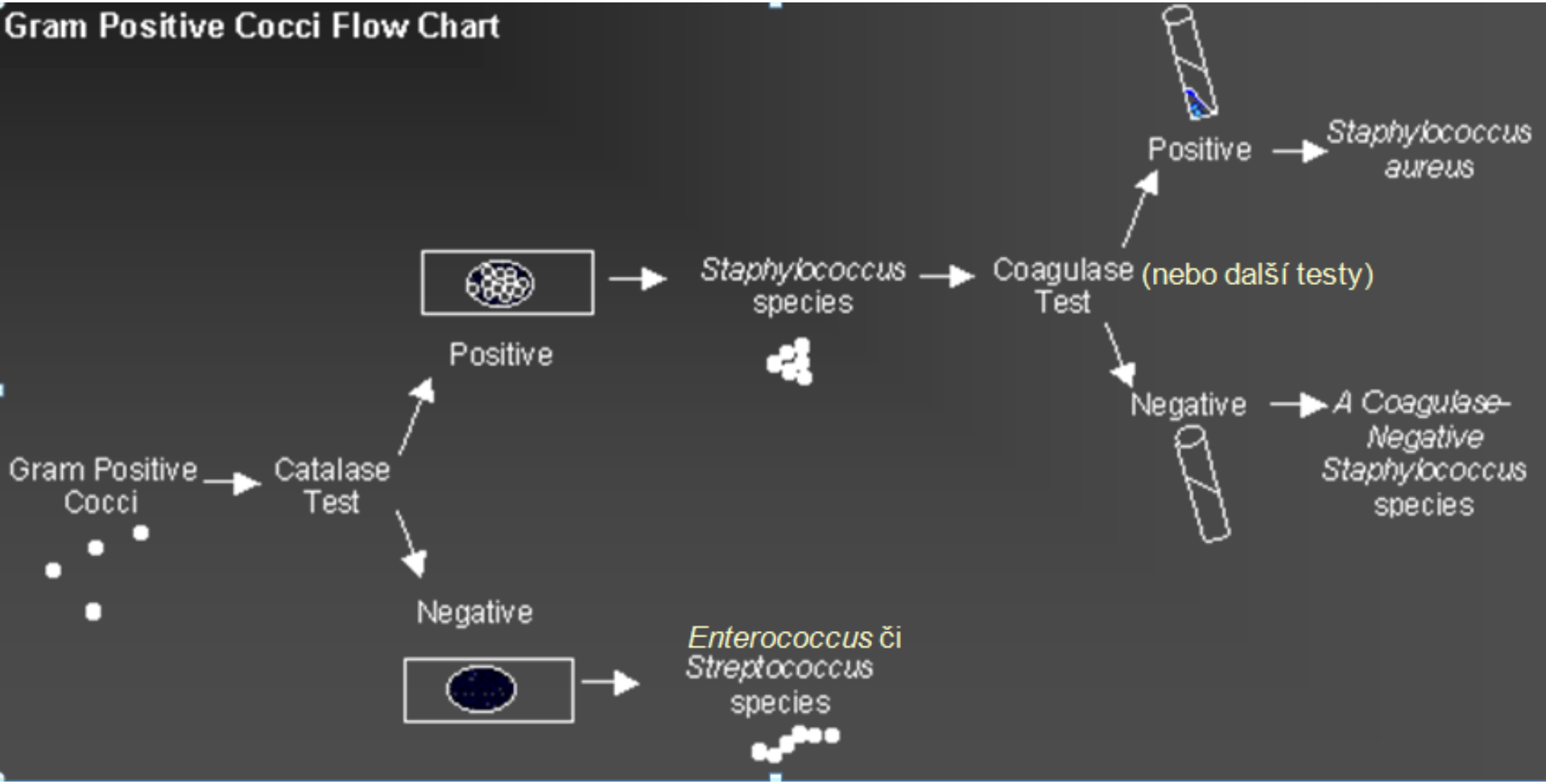


Foto: archiv Mikrobiologického ústavu

Přehled diagnostiky (zjednodušeně)



http://www.ratsteachmicro.com/Staphylococci_Notes/HCOE_CAI_Review_Notes_Staphylococci.htm

Diagnostika CoNS

- 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.

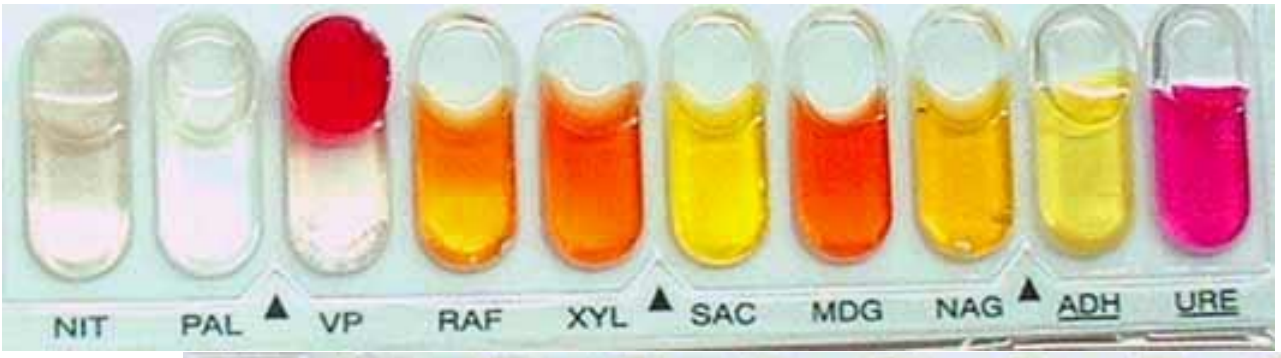
Api Staph – zahraniční obdoba našich STAPHYtestů 16

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



Antimikrobiální terapie - diagnostika

- Diagnostiku uzavírá testování citlivosti na antibiotika, zpravidla difusním diskovým testem.
- Konkrétní provedení může být různé.

Podle situace používáme buď

←kvalitativní, nebo

kvantitativní testy →

http://www.microbes-edu.org

Antimikrobiální terapie

- 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 **aminoglykosidy** raději jen v kombinaci.
- **Glykopeptidová antibiotika** (vankomycin a teikoplanin) jsou v rezervě. Používají se u kmenů rezistentních na oxacilin, takzvaných **MRSA** a **MRSKN**. Pokud by byl stafylokok rezistentní i na ně, nebo pokud pacient toxické glykopeptidy nemůže užít, lze také použít linezolid a další nové látky.

MRSA a jejich detekce

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

Přehled úkolů – diagnostika stafylokoků

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

Po druhém úkolu poznáme grampozitivní koky.

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

Po těchto úkolech odlišíme stafylokoky od ostatních.

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

Úkol 1: Mikroskopie vzorku

- Prohlédněte si mikroskopický preparát hemokultury, obarvený podle Grama. (Nezapomeňte přikápnout imerzní olej! Použijte objektiv imerzní, 100×)
- Pátrejte po grampozitivních kocích ve shlucích, a také po erytrocytech.

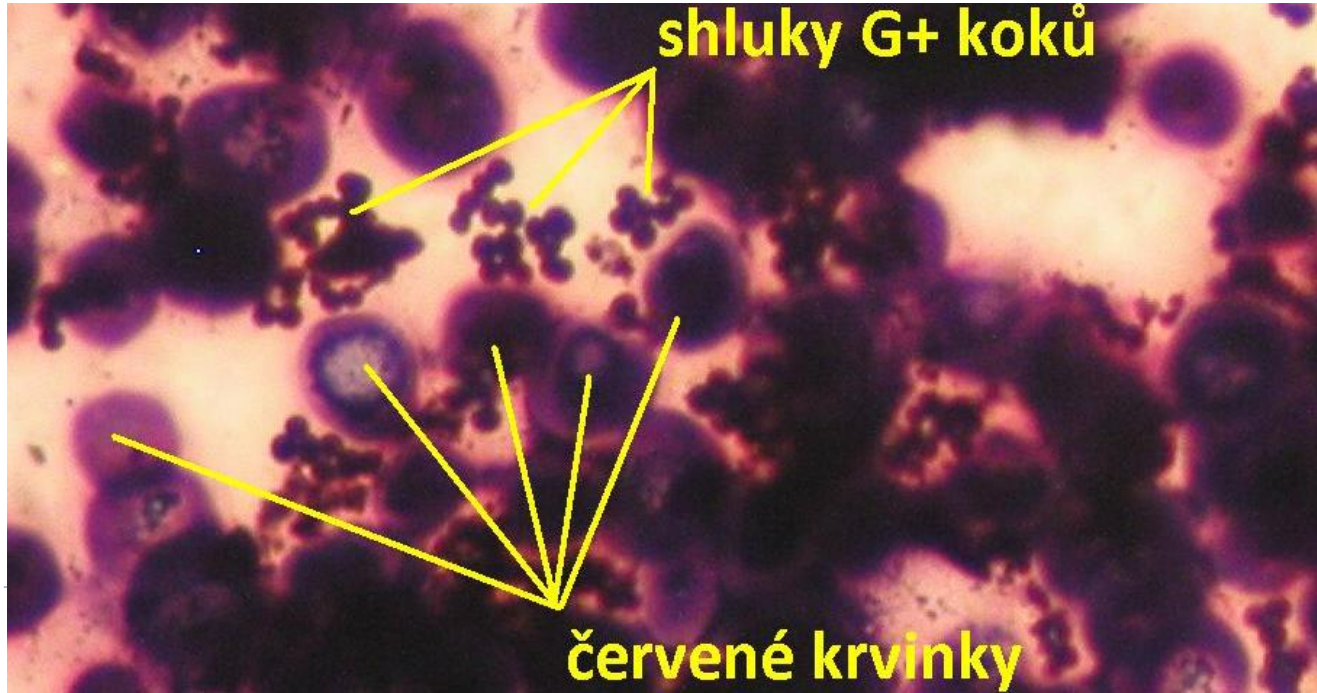


Foto: O. Z.

Úkol 2: 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 olej, imerzní objektiv zvětšující 100×).
- 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: 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 zvlášť si všímejte těch vlastností, které odlišují stafylokoky od ostatních grampozitivních koků (výrazný pigment, konzistence).

Úkoly 4 a 5: Určení 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.

Úkoly 6a, b a c: Odlišení *S. aureus* od CoNS

- 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 6 c) – 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 shluků 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

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.

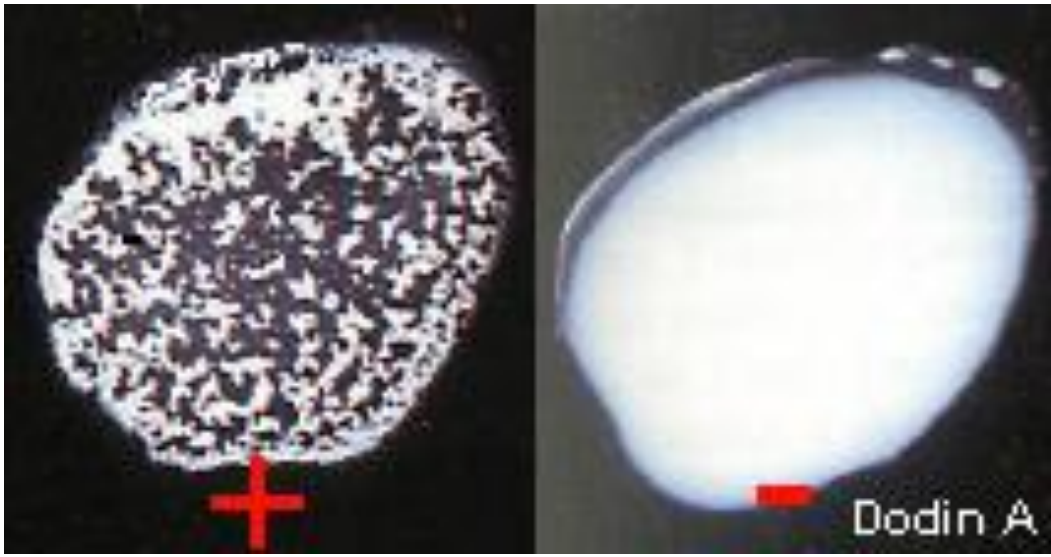
http://microbiology.scu.edu.tw

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 patrno „želé“ uvnitř tekutiny, viz obrázky.

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

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

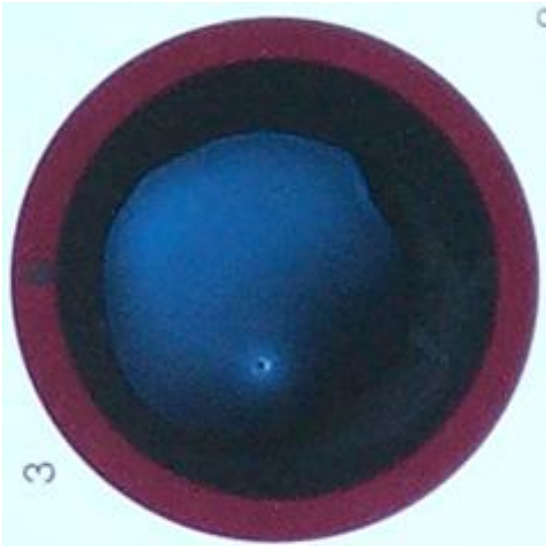


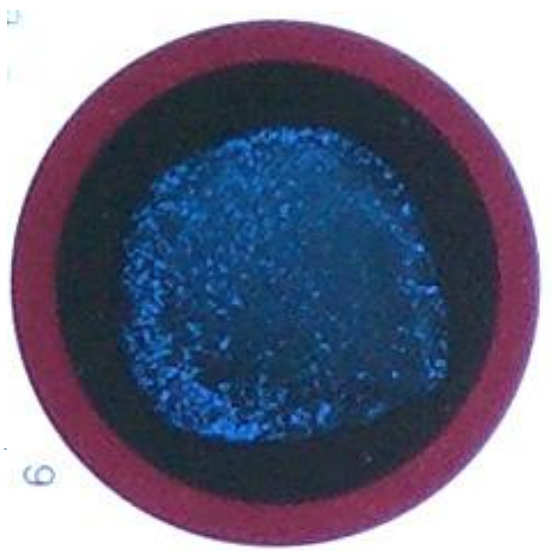
www.microbes-edu.org

Souprava Staphaurex a výsledky

http://www.pathologyinpractice.com

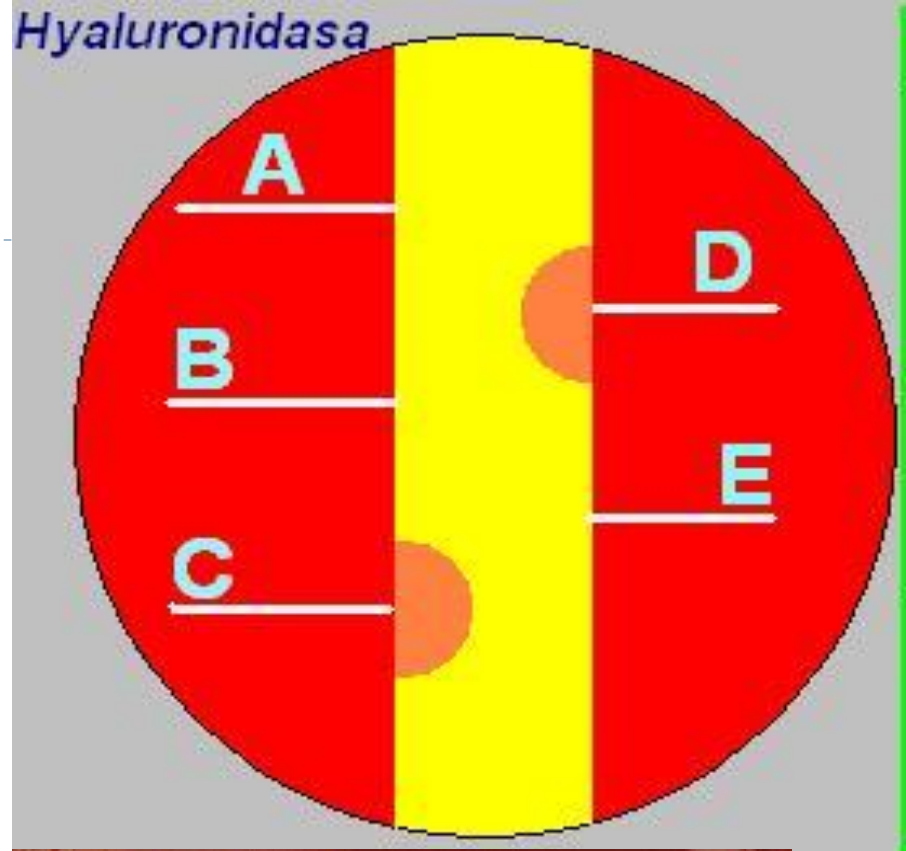
www.microbes-edu.org





6c: Hyaluronidáza (test dekapsulace – „odpouzdření“)

- 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“).



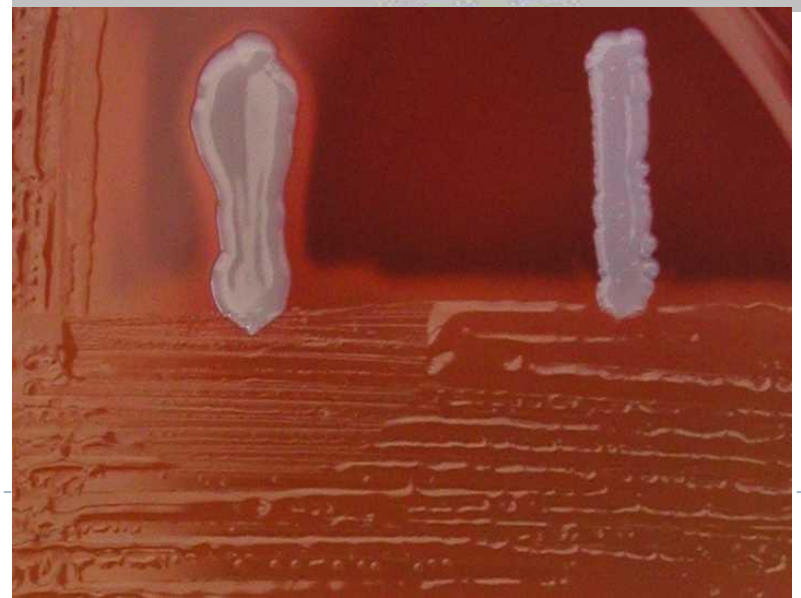
Žlutě "soplovitý" nárůst, oranžově suché kolonie.

Bíle testované kmeny stafylokoků.

Hodnocení:

Kmeny C, D patří k druhu *Staphylococcus aureus*

Kmeny A, B, E patří mezi koagulázanegativní stafylokoky



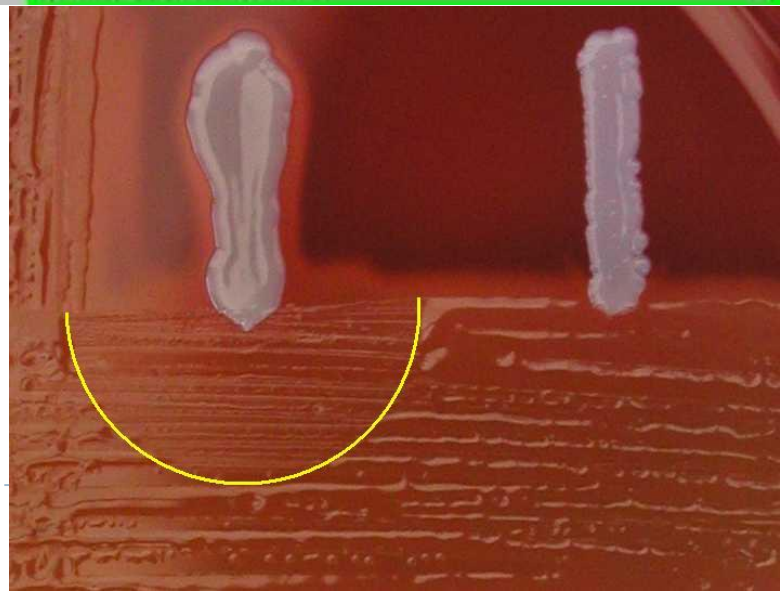


Foto: O. Z.

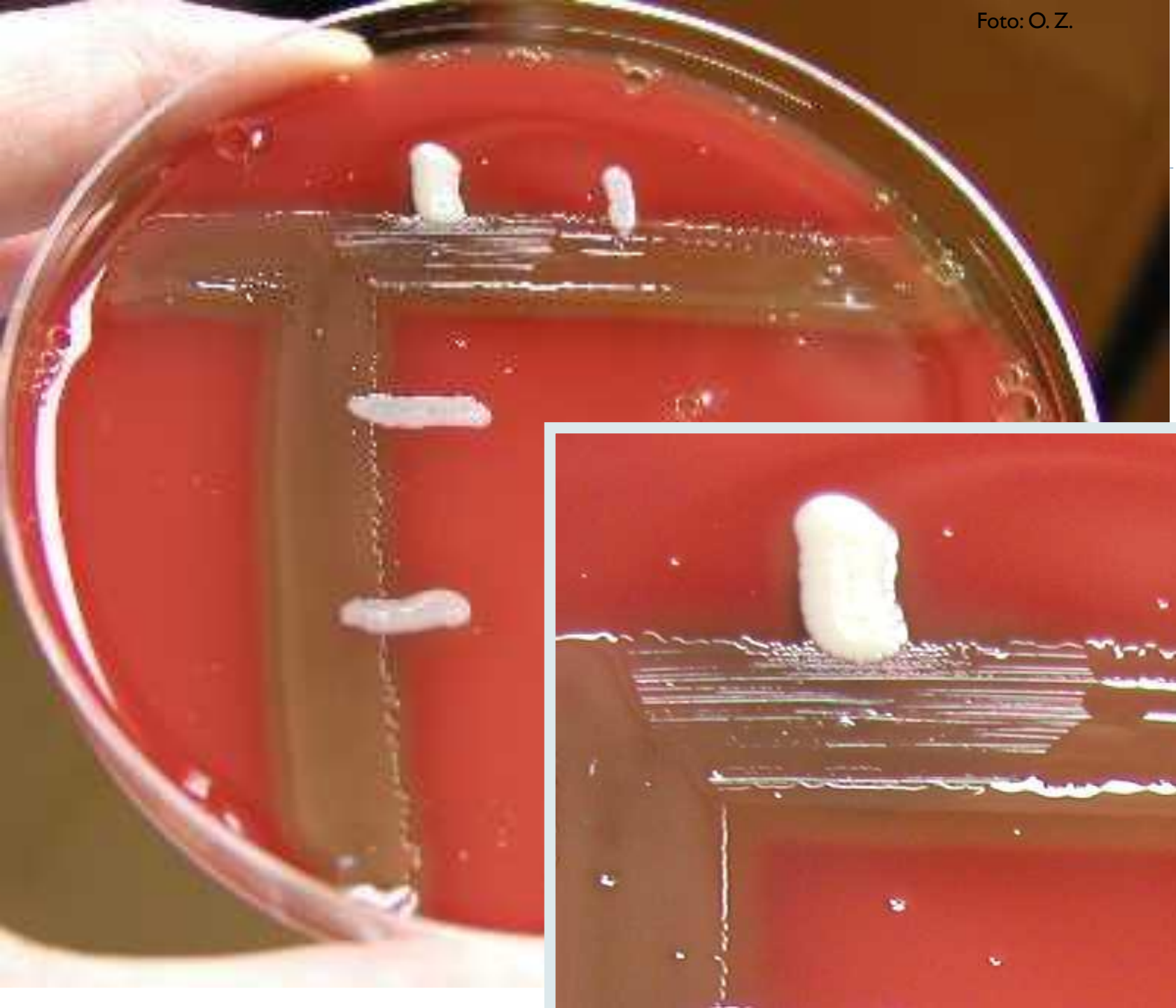


Foto: O. Z.

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 6 c) 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, b a c, popřípadě komerční testy.
- Test tedy slouží k diagnostice koaguláza negativních stafylokoků.

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. reakce
- 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 Zkum	2 H	3 G	4 F	5 E	6 D	7 C	8 B	9 A	10 H	11 G	12 F	13 E	14 D	15 C	16 B	17 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

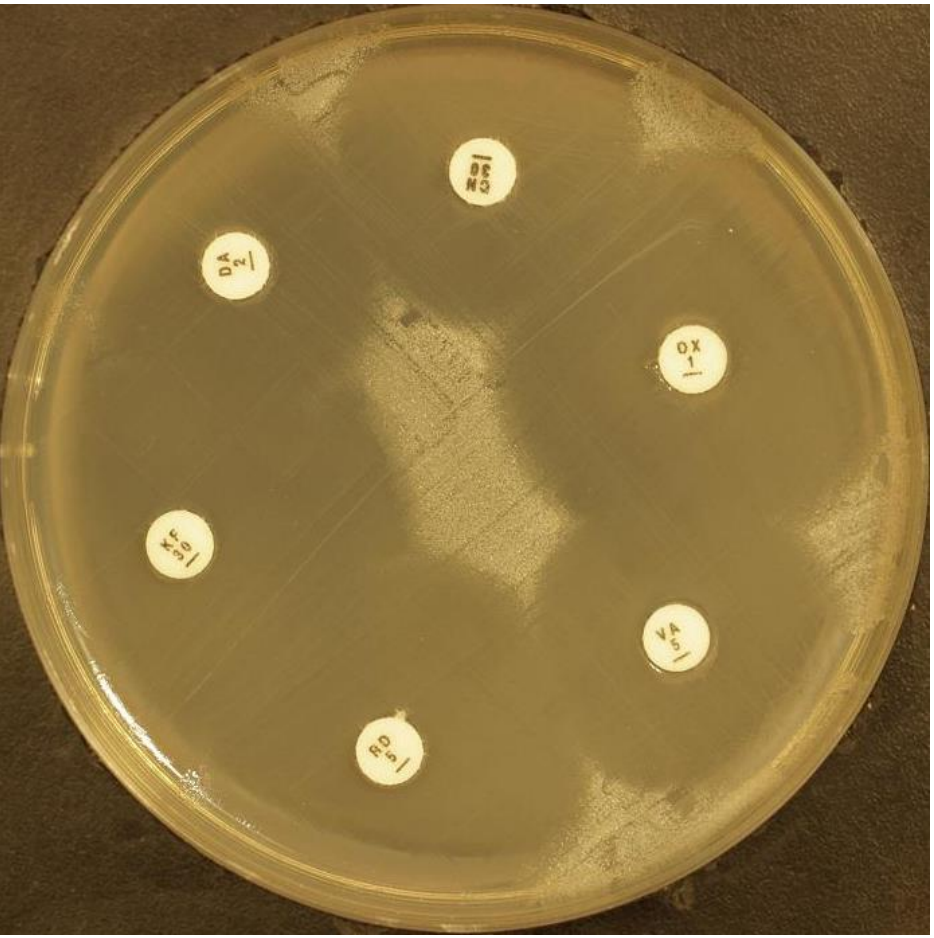
(703 241 = *S. epidermidis*, 97,95 %, T_{in}=1,00)

	1 Zkum	2 H	3 G	4 F	5 E	6 D	7 C	8 B	9 A	10 H	11 G	12 F	13 E	14 D	15 C	16 B	17 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	

Úkol 8a: testy citlivosti

- Odečtěte difusní diskový test – změřte zóny a porovnejte s referenčními zónami.
- Máte k dispozici šestici antibiotik (FOX = cefoxitin, DA = klindamycin, E = erythromycin, SXT = ko-trimoxazol, TE = tetracyklin, C = chloramfenikol; v praxi se používají dvě šestice, označované S1 a S2, my máme test S1).
- Každý set je proveden na kmen STKN (koaguláza negativního stafylokoka) a STAU (zlatého stafylokoka).

Test citlivosti u zlatého a koagulázanegativního stafylokoka



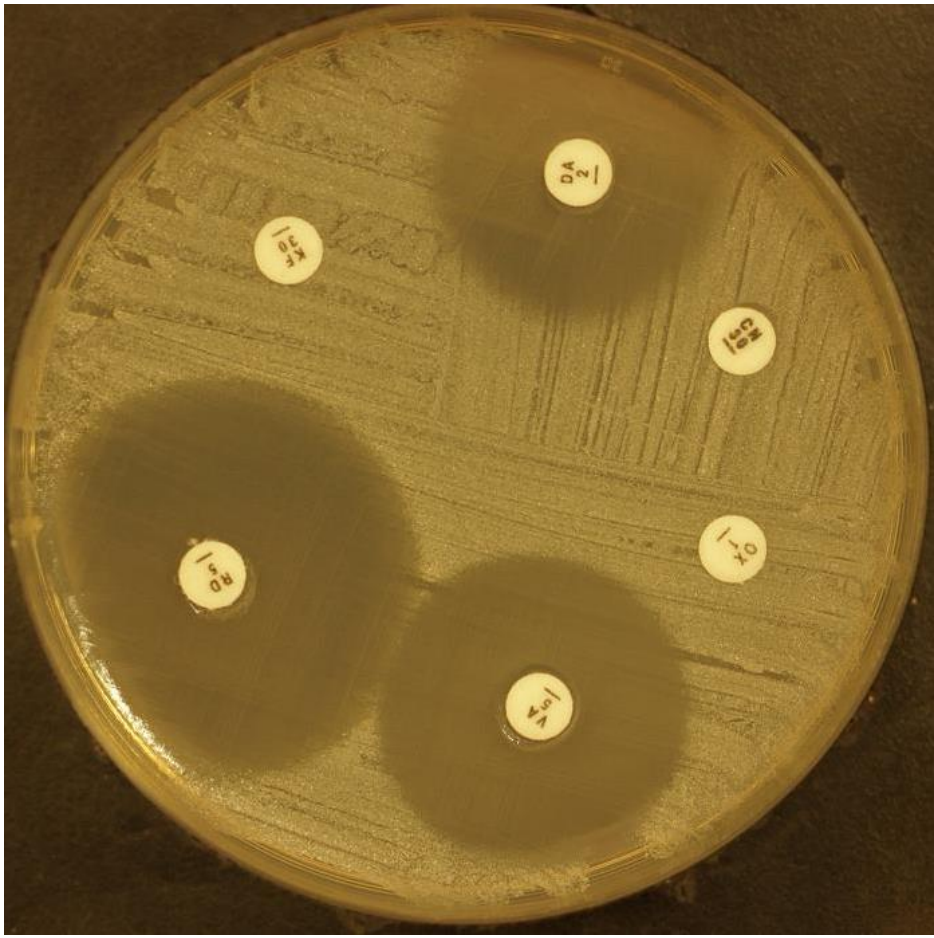


Foto Veronika Holá

Zóny citlivosti některých běžných protistafylokokových antibiotik

Antibiotikum	Zkr.	„C“ je-li ≥ než (mm)	„I“ je-li mezi (mm)	„R“ je-li < než (mm)
Cefoxitin (cefalosporin); interpretace: oxacilin a další	CXT	≥ 22/25*		22/25* *
Erythromycin (macrolid)	E	≥ 21	18–20	< 18
Clindamycin (linkosamid)	DA	≥ 22	19–21	< 19
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	≥ 17	15–16	< 15
Tetracyklin (tetracyklin)	TE	≥ 22	19–21	< 19
Chloramphenikol	C	≥ 18		< 18

*CXT: 22 mm *S. aureus*, 25 mm koagulázanegativní stafylokoky

Úkol 8b – vyhodnocení 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 znamenají, že jde o methicilin-citlivý kmen.

Úkol 2a: Nativní preparát

- Zhotovte nativní preparát a pozorujte pod zvětšením objektivem 40x (NE IMERZE!!!).
- Pozorujte, netřeba nic kreslit ☺

Úkol 3a: Mikrobiologické půdy

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
bujon	tekuté půdy	nažloutlá	pomno-žovací	aeroby
VL-bujon		tmavší		anaeroby
selenitový bujon		narůžovělá	selektivně pomnož.	salmonely
Sabourau-dův agar	pevné půdy ve zkumavce	bílá	selektivní*	houby
Löwentein-Jensen		zelená	obohacená	TBC
krevní agar	pevné půdy v misce	červená	obohacená diagnostická	většinu bakterií
Endova půda		růžová	selektivně diagnostická	především enterobakterie

Úkol 3a: Mikrobiologické půdy

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
MH	pevné půdy na Petriho miskách	skoro bílá	speciální	atb citlivost
NaCl		hnědá	selektivní	stafylokoky
VL-agar		červená	jako KA	anaeroby
XLD a blízký MAL		oranžová	selektivně diagnostická	salmonely
čokoládový agar		hnědá	obohacená	hemofily, neisserie
Levinthalův agar		nažloutlá	obohacená	hemofily
Slanetz-Bartley		růžová	selektivně diagnostická	enterokoky

Po tomto cvičení byste měli znát:

- Diagnostika rodu *Staphylococcus* (odlišení od strepktokoků, enterokoků; odlišení *S. aureus* a CoNS)
- Funkci volné a vázané plasmakoagulázy a její využití v diagnostice
- Funkci hyaluronidázy a její využití v diagnostice
- Odečítání difúzních diskových testů a jejich interpretace
- Základní mikrobiologické půdy a jejich použití