

P01

**Mikroskopie a kultivace
v lékařské mikrobiologii**

**Testování citlivosti na
antibiotika**

Diagnostika stafylokoků

Osnova

- úvodní pokyny
- rod *Staphylococcus*
- diferenciální diagnostika rodu *Staphylococcus*
- praktické úkoly
 - mikroskopie a kultivace
 - dif. dg. rodu *Staphylococcus*
 - Staphytest 16
 - difúzní diskový test

Bezpečnost práce v mikrobiologické laboratoři

- postudujte a podepište Provozní řád praktických cvičení z lékařské mikrobiologie + První pomoc – předepsaný postup při laboratorních nehodách

Úvodní pokyny

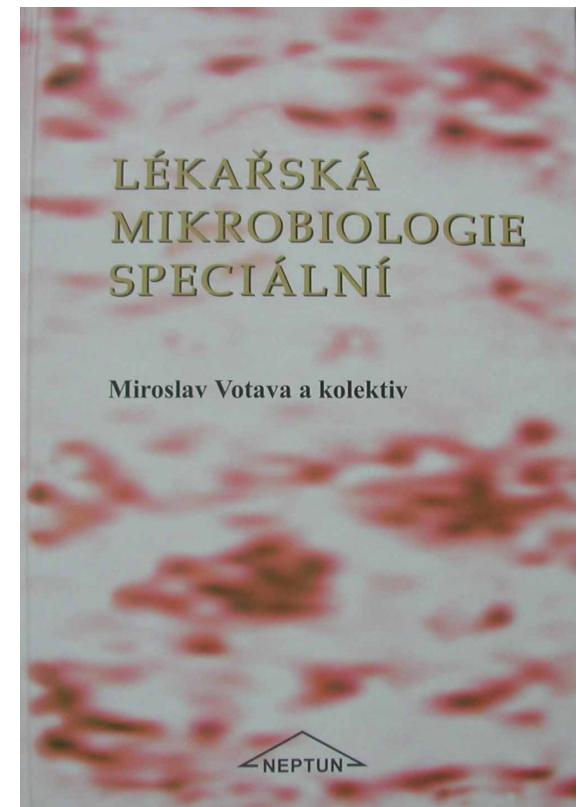
- **šatní skříňky** pro studenty jsou **1., 2. a 4.** od okna
- **nepoužívejte 3. skříňku**, i kdyby byla otevřená (skříňka studentů střední zdravotnické školy)
- **klíče** od šatních skříněk **nechávejte vždy na háčcích** vedle dveří, visí zde i **klíček od WC** (vracejte na místo po použití toalety)
- **vstup studentů do prostor ústavu za praktikárnou je zakázán**

Nakládání s odpady

- **malé kousky** můžete dát do nádobek na svých stolech
- **použité zápalky** mají své vlastní misečky
- **větší odpadky** vyhazujte do **koše vedle umyvadel**
- **rozbité sklo** patří **do žlutého kbelíčku vedle koše**
- **mikroskopické preparáty připravené přímo vámi** patří po použití do dezinfekce

Literatura

- **protokoly k praktickým cvičením (IS MU) nutné!**
- budete potřebovat **Lékařskou mikrobiologii obecnou (2005)** a **Lékařskou mikrobiologii speciální (2003)**
- volitelně:
 - Lékařská mikrobiologie
 - vyšetřovací metody
 - Klinická mikrobiologie



Podmínky zápočtu

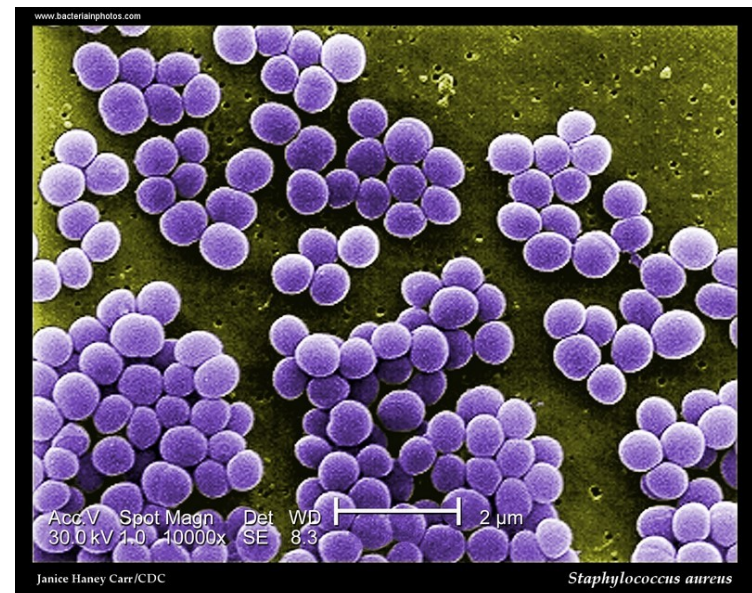
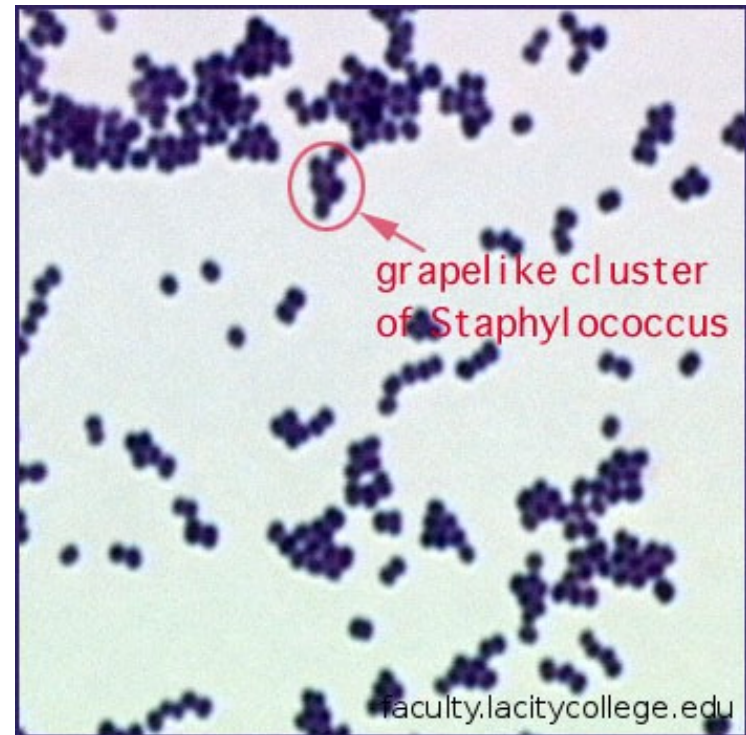
- **účast v praktiku** by měla být pokud možno **stoprocentní** (možná jedna neomluvená absence, další musí být omluvené)
- **i přes absenci je nutné doplnit si příslušné znalosti, vyplnit protokol a kontrolní otázky**
- **při více omluvených absencích vhodné praktikum nahradit v jiné skupině** (po předchozí domluvě s daným vyučujícím)
- **pro zápočet je také nutno mít vyplněny všechny kontrolní otázky na IS MU**
- **zápočtový test** (12 otázek, jedna správná odpověď, alespoň 7/12 dobře)

Pokyny k vyplňování protokolů

- **obrázky opravdu kreslete** (nakreslete koky, nepište „vidím koky“)
- obrázky **kreslete barevně**, noste pastelky (alespoň červená a modrá)
- **kreslete to, co vidíte** (pokud se vám koky v mikroskopu dotýkají, kreslete je tak, nekreslete jen obrysy, ale probarvujte)
- **pokud nevidíte to, co máte vidět, upozorněte asistenta (!)**
- **protokoly jsou kontrolovány u zkoušky a mají vliv na výslednou známku!**

Stafylokoky

- **G+ koky**, ve shlucích (lat. *staphyle* – hrozen)
- **fakultativně anaerobní**, nesporulující, nepohyblivé
- **kataláza pozitivní**, oxidáza negativní (kromě *S. sciuri*), poměrně **odolné** proti vyschnutí, vyšším koncentracím solí (diagnostický znak)



Stafylokoky (2)

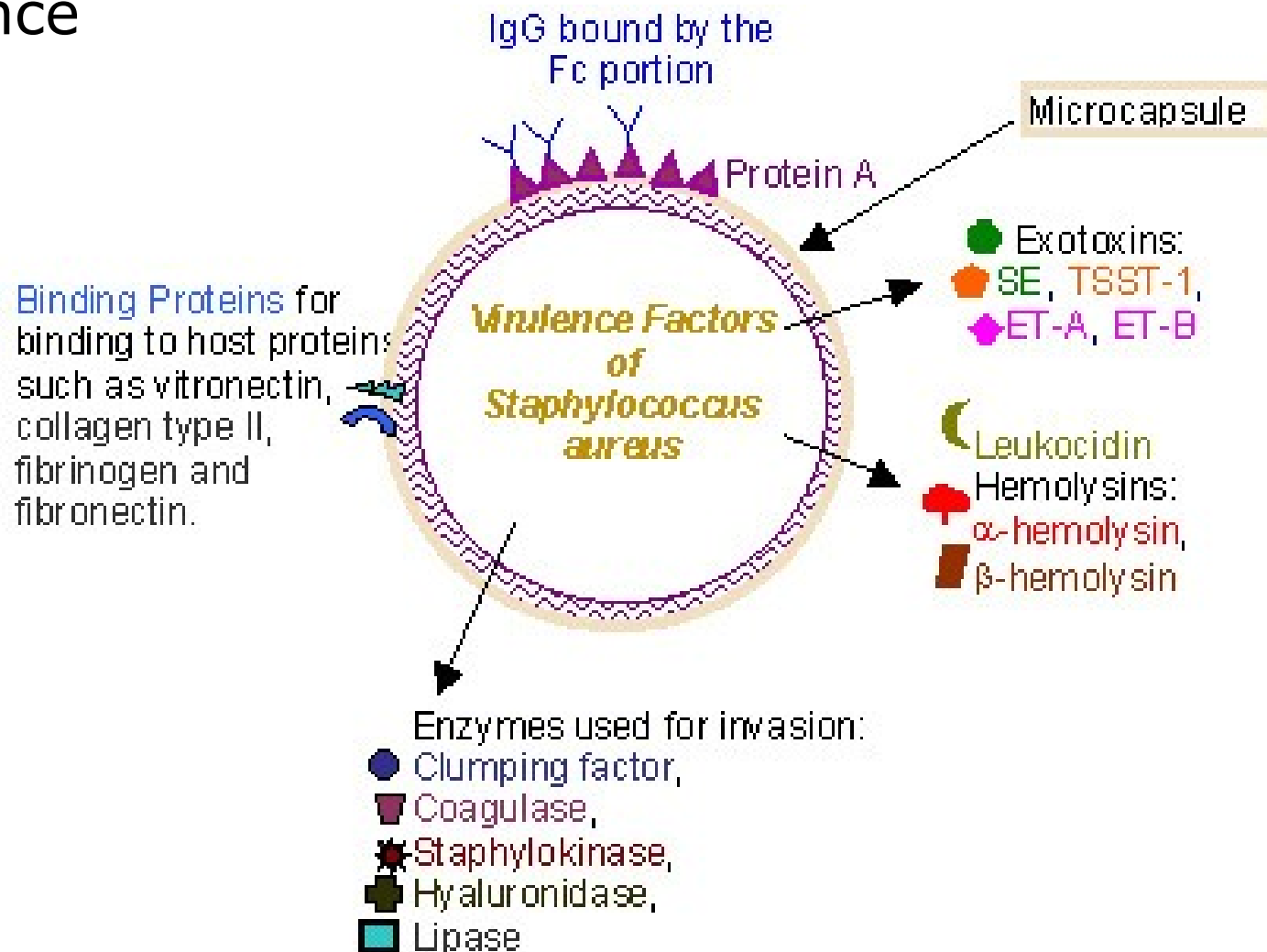
- **rozdělení** podle schopnosti koagulovat plazmu:
 - **koaguláza pozitivní** (*S. aureus*, *S. intermedius*)
 - **koaguláza negativní** (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*)

Staphylococcus aureus **(zlatý stafylokok)**

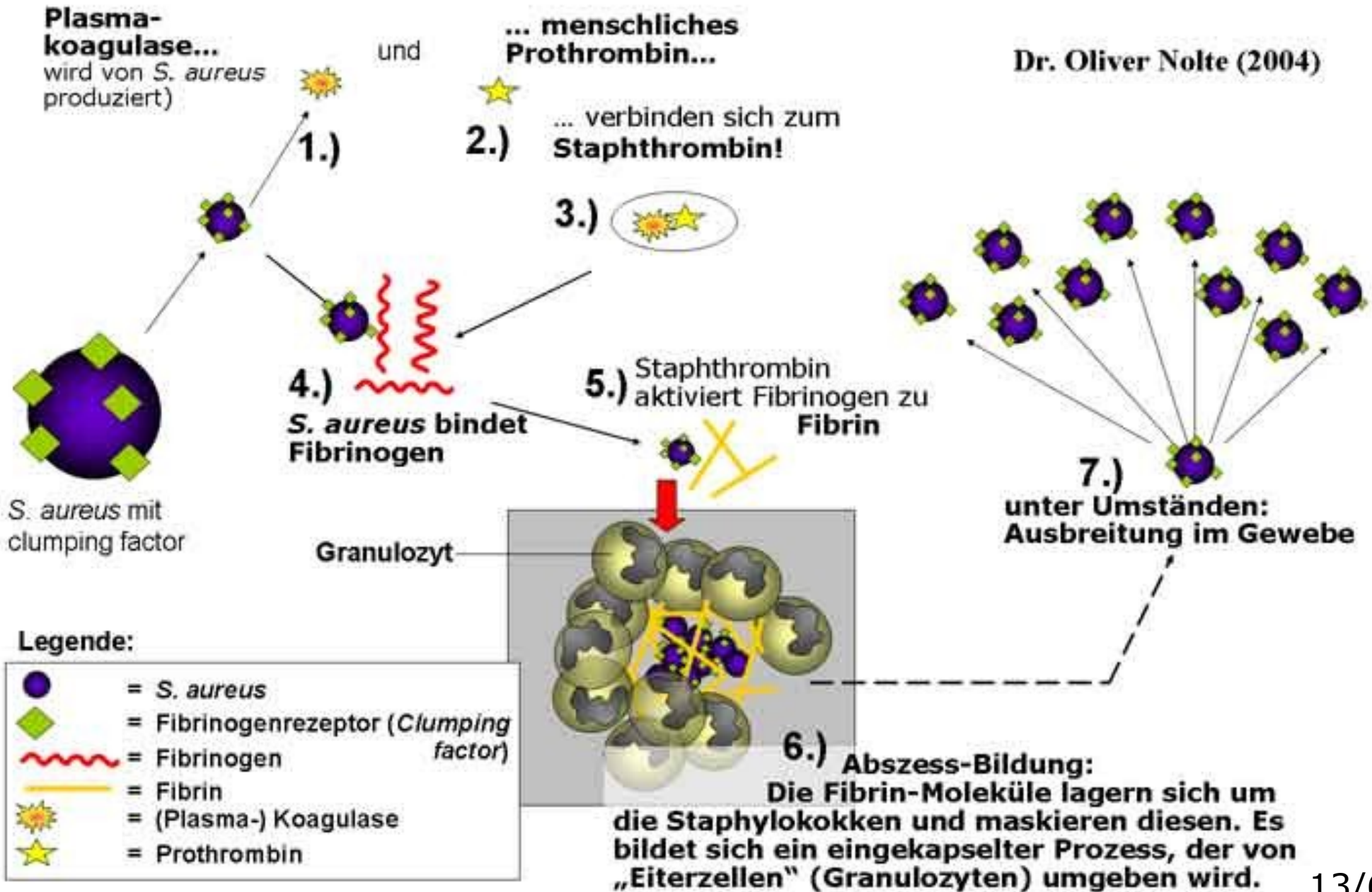
- **významný koaguláza pozitivní stafylokok**
- u třetiny lidí žije na kůži si sliznicích a nevyvolává potíže (dokud není porušena obranyschopnost)
- **charakteristickým rysem** infekcí je **tvorba** ohraničených zánětlivých ložisek (**abscesů**)
 - **absces = dutina plná hnisu** (rozpadající se leukocyty, bakterie), **ohraničená** stěnou z fibrinu a fibroblastů, okolní tkáň je zanícená
 - vznik pomocí **plazmakoagulázy** (volné i vázané, tzv. clumping faktoru)
- **široká škála faktorů virulence** (koagulázy, kataláza, hyaluronidáza, lipázy, nukleázy, ...)

Faktory virulence *S. aureus*

- ne všechny kmeny *S. aureus* disponují všemi faktory virulence



Vznik abscesu



Staphylococcus aureus (2)

- **onemocnění:**
 - **pyogenní:** pyodermie (impetigo, folliculitis, furunculus atd.), hnisání ran, abscesy vnitřních orgánů, osteomyelitidy, bronchopneumonie, endokarditidy, sepse, ...
 - infekce spojené s **působením toxinů:** exfoliativní dermatitis (SSSS), syndrom toxického šoku, enterokolitida
 - **intoxikace:** stafylokoková enterotoxikóza

***Staphylococcus aureus* – bulózní impetigo**



- velké puchýře, které rychle praskají a zůstávají po nich červená mokvající ložiska, nejčastěji na obličeji

Staphylococcus aureus – impetigo



- puchýře uložené v epidermis naplněné hnisem, typicky u dětí

***Staphylococcus aureus* – otitis externa s furunklem**



***Staphylococcus aureus* – infekce kůže s krustami**



Staphylococcus aureus – mozkový absces



medicalimages.wordpress.com

Koaguláza negativní stafylokoky

- ***S. epidermidis***, *S. hominis*, *S. haemolyticus* a asi čtyřicet dalších druhů a poddruhů
- hlavní součástí běžné bakteriální **mikroflóry kůže**
- **oportunní patogeny**, možní původci močových infekcí (hlavně ***S. saprophyticus***), případně i infekcí ran, katetrových sepsí aj.
- nález se hodnotí jinak např. ve výtěru v nosu či ve stolici, jinak v moči a zcela jinak v hemokultuře

Staphylococcus epidermidis

- **nejběžnější** koaguláza negativní stafylokok
- **oportunní patogen**
 - nejčastěji neutropenici, imunokompromitovaní (tj. i novorozenci), intravenózní uživatelé drog (heroin)
 - **nemocní se zavedenými či implantovanými pomůckami (intravenózní katetry, umělé srdeční chlopně, shunty, kardiostimulátory, permanentní močové katetry, kloubní protézy, šrouby, ...)**
→ **tvorba biofilmových infekcí**
- **infekce krevního řečiště (bakteriémie)**, nejčastěji v souvislosti se zavedenými **intravenózními katetry**
 - může dojít ke **katetrové sepsi** s příznaky šoku

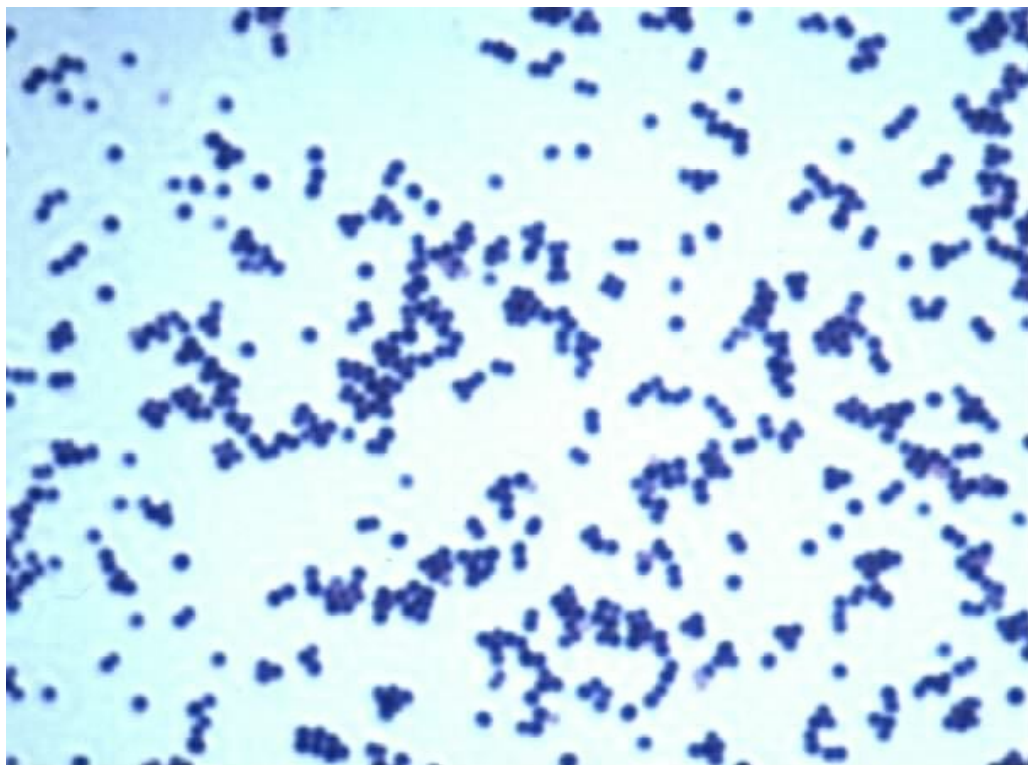
Přehled identifikačních metod

- **přímé metody** (mikrob, jeho část, produkty)
 - mikroskopie (průkaz ve vzorku i identifikace)
 - kultivace (průkaz + identifikace)
 - biochemická identifikace (jen identifikace)
 - průkaz antigenu (průkaz + identifikace)
 - průkaz NK (průkaz ve vzorku)
 - pokus na zvířeti (průkaz ve vzorku)
- **nepřímé metody** (průkaz protilátek)

Diagnostika rodu *Staphylococcus*

- **mikroskopie:** G+ kok
- **kultivace:** na KA **kolonie větší** (1-3 mm), ploché, máslovité konzistence, **pigmentované (nejčastěji bílé, krémové, zvláště po delší kultivaci žluté až nazlátlé** – hlavně u zlatého stafylokoka)
- **biochemické testy: kataláza pozitivní, oxidáza negativní**, biochemicky lze rozlišit jednotlivé druhy (např. STAPHYtest 16)
- antigenní analýza a speciální testy možné

Dg. rodu *Staphylococcus* (2)



Autor: Prof. MVDr. Boris Skalka, DrSc.



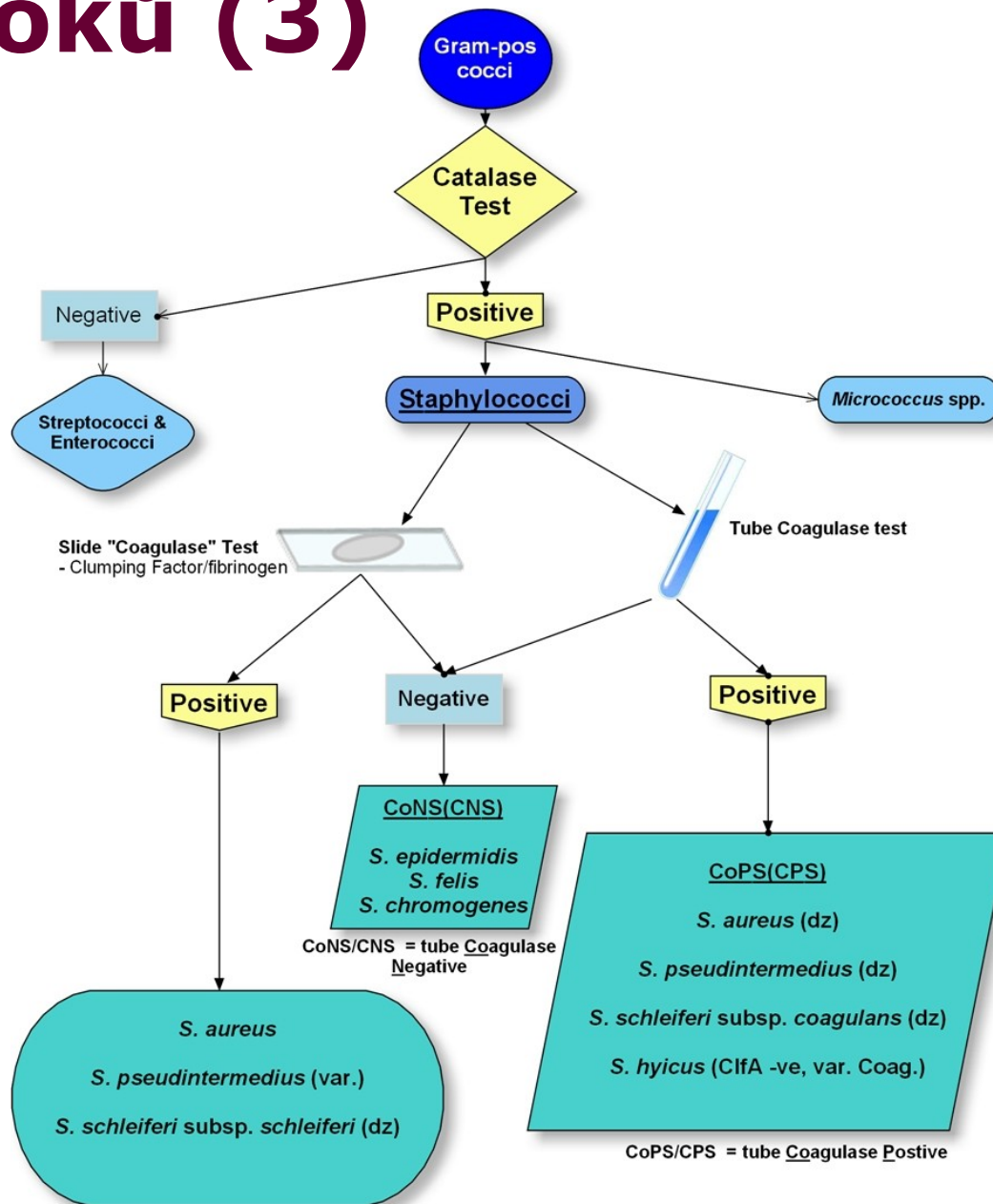
Diferenciální diagnostika stafylokoků

- **určení do rodu *Staphylococcus*:**
 - Gramovo barvení: rozlišení **G+/G-**, **kok/tyčka**
 - kultivace na selektivní půdě (**KA s 10 % NaCl**, 6,5 % NaCl se využívá pro kultivaci enterokoků)
 - **katalázový test pozitivní** (prokázání enzymu katalázy, 3% H₂O₂), oxidáza negativní
- **rozlišení *S. aureus* od CoNS** (koag. neg. stagylokoky)
 - *S. aureus* má pozitivní koagulázu vázanou (clumping factor) i volnou a hyaluronidázu
- další **rozlišení v rámci rodu pomocí komerčních testů** (např. STAPHYtest 16 atd.)

Diferenciální diagnostika stafylokoků (2)

- méně spolehlivá vodítka:
 - CoNS produkují je delta hemolysin, zlatý stafylokok i alfa a beta hemolysin → ***S. aureus* má výraznější hemolýzu na KA**
 - ***S. aureus*** má větší průměr kolonií a nazlátlé zbarvení (hlavně po delší kultivaci)
 - *S. aureus* tvoří větší shluky v mikroskopii

Diferenciální diagnostika stafylokoků (3)



dz = double-zone hemolysis
var. = variable (10 - 90%)
ClfA = Clumping Factor

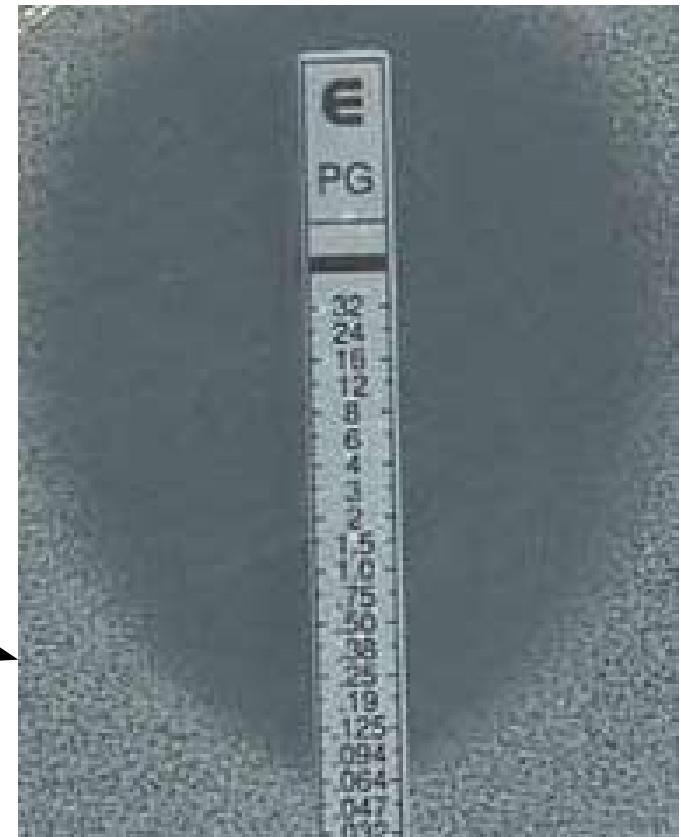
Testování citlivosti na ATB

- diagnostiku uzavírá testování citlivosti na antibiotika, zpravidla difusním diskovým testem
- konkrétní provedení může být různé



kvalitativní testy

kvantitativní testy



ATB terapie

- u **stafylokoků** je lékem volby **oxacilin**
- u **močových infekcí cefalosporiny** první generace
- **makrolidy** jen u **alergických** osob
- **linkosamidy** mají význam u infekcí pohybové soustavy (dobrý průnik do kostní dřeně)
- aminoglykosidy raději jen v kombinaci
- **glykopeptidová antibiotika** (vankomycin a teikoplanin) jsou **rezervní**
 - u kmenů rezistentních na oxacilin, takzvaných **MRSA** a **MRSKN**
 - v případě rezistence nebo přílišné toxicity, lze také použít linezolid a další nové látky

Detekce MRSA

- **meticilin rezistentní stafylokoky** (MRSA) jsou epidemiologicky závažné kmeny, často způsobující **nozokomiální infekce**
- příčinou je **změna** tzv. **penicillin binding proteins** (PBP)
 - transpeptidázy účastnící se výstavby buněčné stěny
 - kódovány genem *mecA* (PBP2a)
 - beta-laktamy inhibují jejich účinek
- na problém upozorní **malá zóna u oxacilinu** (může být způsobena i jinými vlivy)
- **za průkazné se považuje, je-li malá zóna nejen u oxacilinu, ale i u cefoxitinu**
- **speciální kultivační půdy**

Úkol 1: Mikroskopie infekčního materiálu

- prohlédněte si mikroskopický **preparát hemokultury**, obarvený podle Grama
- nezapomeňte přikápnout **imerzní olej**, použijte imerzní **objektiv 100×**
- pátrejte po **grampozitivních kocích ve shlucích** a také po **erythrocytech**, případně **leukocytech**



Úkol 2a: Nativní preparát

- plastové zkumavky obsahují **výtěry rozmíchané v médiu**
- **kápněte na sklíčko**, kapku **překryjete krycím sklíčkem** a **pozorujte epitelie**, popř. **leukocyty**, a mezi nimi **mikroby**
- **výsledky zakreslete a popište**

Úkol 2a: Ukázka nativního preparátu C. A. T.



Copyright ©2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved. <http://yxzl.baiduyy.com>

- epiteliální bb. s adherovanými bakteriálními buňkami (malé tečky); pacientka s bakteriální vaginózou

Úkol 2b: Příprava fixovaného preparátu, Gramovo barvení

- obarvete podle Grama čisté kultury předložených mikrobů, výsledky pozorování zakreslete a zapište
- **Gramovo barvení:**
 - **příprava:** natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem
 - **barvení:** **krystalová violet** 30 s, (voda), **Lugolův roztok** 30 s, (voda), **alkohol** 15–20 s (do viditelného výstupu barviva), voda, **safranin** 60 s, voda, osušit, imerzní olej, imerzní objektiv zvětšující 100×
- tři kmeny budou G+ koky, jeden G– tyčka

Úkol 3a: Tekuté půdy

- **pomnožovací:**
 - nejběžnější a univerzální
 - bujón pro aerobní kultivaci a VL-bujón pro anaerobní kultivaci (VL = viande-levure, obsahuje masokvasničný extrakt)
- **selektivně pomnožovací:**
 - pomnožení určité bakterie a potlačení množení jiných
 - selenitový bujón pro salmonely
- **obohacené pomnožovací:**
 - z kvalitnějších extraktů (např. BHI = mozkosrdcová infuze), hydrolyzátů (kasein), vitamínů (kvasničný hydrolyzát) atd. → pro náročnější bakterie (streptokoky, hemofily, patogenní neisserie)

Úkol 3a: Pevné půdy

- **základní:**

- základem je masopeptonový bujon, NaCl a 1,5 % agaru
- pro málo náročné bakterie
- **obohacené:** přidávají se další složky jako cukry, růstové faktory, krev atp.

- **diagnostické:**

- přidání složek, které různě reagují na různé druhy metabolismu
- **krevní agar**, půdy pro **biochemické určení mikrobů**, půdy chromogenní a fluorescenční

Úkol 3a: Pevné půdy (2)

- **selektivní:**
 - látky **potlačující růst některých skupin mikrobů**, podporují **růst cílových mikroorganismů**
 - **KA s 10 % NaCl** pro stafylokoky
 - **KA s amikacinem** pro streptokoky a enterokoky
 - **KA s azidem sodným** pro enterokoky
- **selektivně diagnostické:**
 - kombinace dvou předchozích skupin
 - **ENDO** – selektivní složka fuchsin, diagnostická složka fuchsin odbarvený siřičitanem a laktóza)
 - **XLD, MAL** – pro detekci salmonel

Úkol 3a: Půdy pro speciální účely

- **MH agar** (Müllerův-Hintonové agar):
 - *in vitro* **testování citlivosti na antimikrobiální látky**
 - slouží zároveň ke sledování pigmentů bakterií
 - podobný MPA – místo peptonu (brání difuzi antimikrobiálních látek) kaseinový hydrolyzát a škrob (detoxikuje některé metabolity mikrobů)
- **půdy pro sledování faktorů virulence:**
 - půda s kongočervení pro detekci stafylokokového biofilmu
 - žloutková půda pro histotoxická klostridia

Úkol 3a: Půdy v klinické mikrobiologii

Název	Druh	Barva	Typ	Bakterie
bujon	tekuté půdy	nažloutlá	pomno- žovací	aeroby
VL-bujon				anaeroby
selenitový bujon			selektivně pomnož.	salmonely
Sabourau- dův agar	pevné půdy ve zkumavce	skoro bezbarvá	selektivní*	houby
Löwentein- Jensen		bílá až velmi světle zelená	obohacená	mykobakteria (pův. TBC)
krevní agar	pevné půdy v misce	červená	obohacená diagnostická	většinu bakterií
Endova půda		růžová	selektivně diagnostická	především enterobakterie

*pokud je přidáno ATB

Úkol 3a: Půdy v klinické mikrobiologii (2)

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

Úkol 3b: Růst na krevním agaru

- **vyplňte tabulku na první straně** v řádcích „Úkol č. 3“
- do „jiných“ napište to zajímavé, co se nevejde jina
- **snažte si povšimnout rozdílů mezi koloniemi G+ koků a G- tyčky** (zvláště pak **pigmenty, konzistence, hemolýza** apod.)

Úkol 4: Růst bakterií na krevním agaru s 10 % NaCl

- **selektivní půda pro stafylokoky**
- zhodnoťte schopnost růstu předložených kmenů na krevním agaru s 10 % NaCl
- zapište „+“ pokud kmen roste a „-“ pokud neroste

Úkol 5: Katalázový test

- **prokažte přítomnost enzymu katalázy**
- setřete kličkou kolonie předložených kmenů a vnešte je do kapky 3% H₂O₂ na podložním sklíčku
- zaznamenejte reakci u všech kmenů, do tabulky pište „+“ a „-“
- nelze přeskočit předchozí kroky identifikace, pozitivní katalázu má spousta bakterií, relativně průkazná je jen tehdy, víme-li, že náš kmen je G+ kok



Úkol 6: Testy pro diferenciaci *S. aureus*

- 6a) **Test na clumping faktor** (test vázané plasmakoagulázy)
- 6b) **Plasmakoagulázový test** (test volné plasmakoagulázy)
- 6c) **Detekce hyaluronidázy**

Úkol 6a: Test na clumping faktor (test vázané plasmakoagulázy)

- kolonie se vmíchají do kapky králičí plasmy na podložním sklíčku
- **pozitivita se projeví jako tvorba sraženin** či vloček v kapce plasmy (viz obrázek na další obrazovce)
- nejde vlastně o koagulaci, ale o **aglutinaci** plasmy
- test není příliš spolehlivý

Clumping-Factor positiv



Clumping-Factor negativ



Úkol 6b: Plasmakoagulázový test (test volné plasmakoagulázy)

- klasický test 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 při zakreslování do protokolu (volná hladina vs. koagulovaná plazma)



Úkol 6c: Detekce hyaluronidázy

- **hyaluronidáza produkovaná zlatým stafylokokem** (ne však koaguláza negativními stafylokoky) rozpouští pouzdro (kapsulu) opouzdřených bakterií
- používá se druh *Streptococcus equii*, pro člověka nepatogenní
- ztráta pouzdra se projeví změnou vzhledu streptokoka (ztráta mukózního vzhledu v blízkosti *S. aureus*)
- velmi levný a spolehlivý test (na rozdíl od clumping faktoru)
- **najděte pozitivní kmen, který ve svém okolí rozpustil slizový obal streptokoka**

Úkol 6c: Detekce hyaluronidázy (2)

Hyaluronidasa



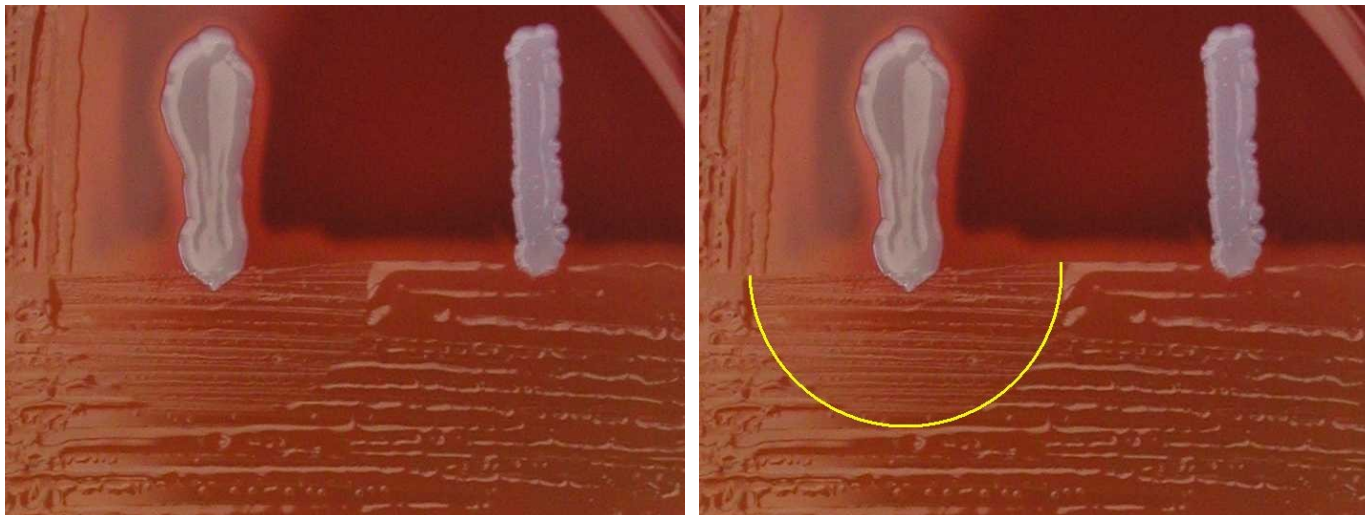
Žlutě "soplovitý" nárůst,
oranžově suché kolonie.

Bíle testované kmeny
stafylokoků.

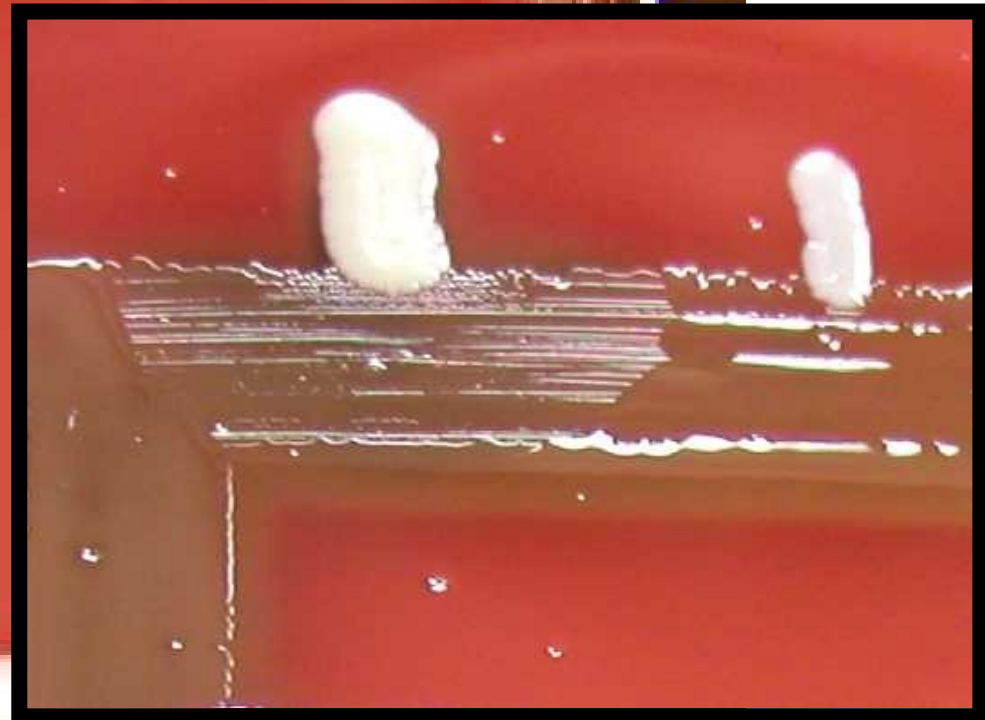
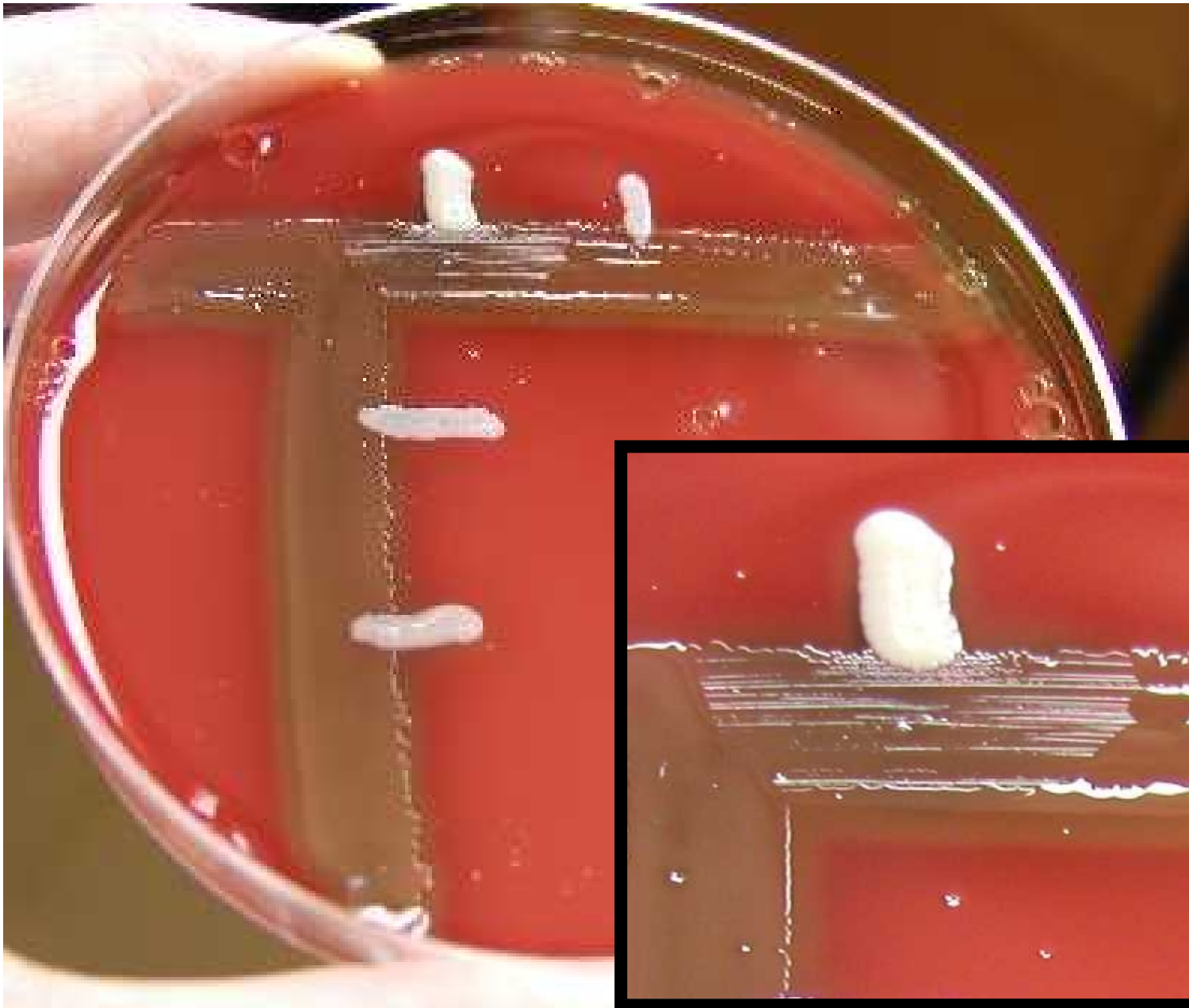
Hodnocení:

Kmeny C, D patří k druhu
Staphylococcus aureus

Kmeny A, B, E patří mezi
koagulázanegativní
stafylokoky

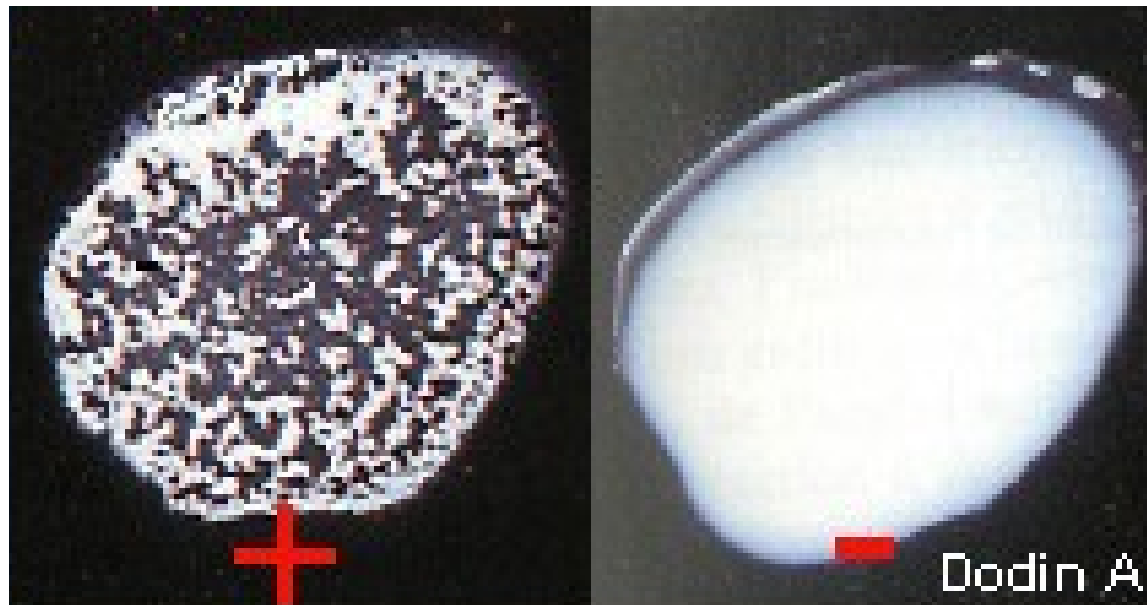


Úkol 6c: Detekce hyaluronidázy (3)

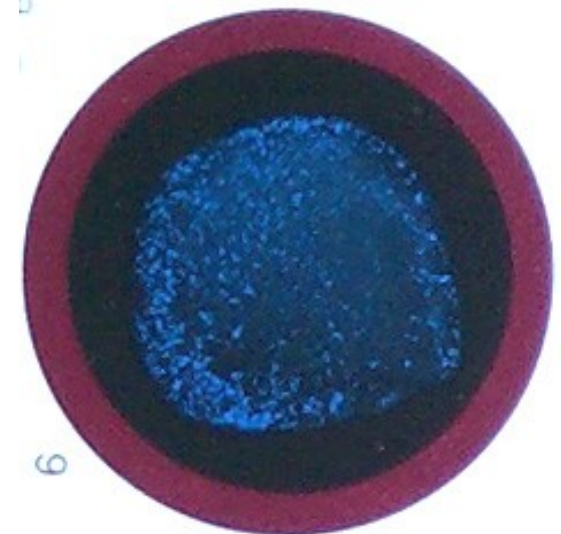
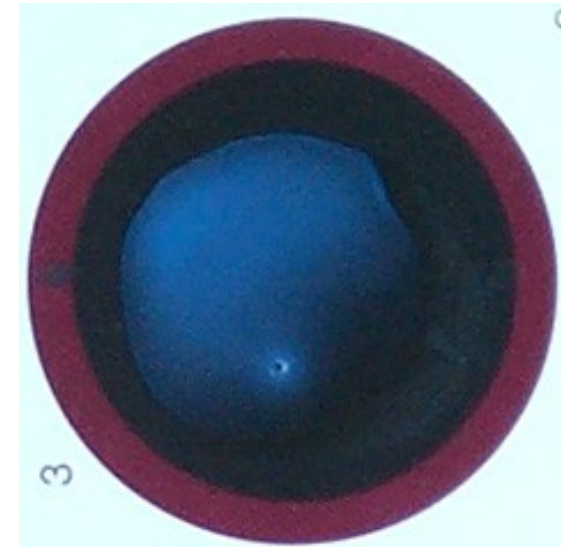


Úkol 6: Komerční testy

- v praxi je neprovádíme z důvodu finanční náročnosti
- provedením připomínají clumping factor
- jsou spolehlivější než volná koaguláza



Úkol 6: Komerční testy (Staphaurex)



Úkol 7: Bližší určení stafylokoků pomocí biochemického mikrotestu (STAPHYtest 16)

- 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**

Úkol 7: Bližší určení stafylokoků pomocí biochemického mikrotestu (STAPHYtest 16) (2)

- **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)

Úkol 7: Bližší určení stafylokoků pomocí biochemického mikrotestu (STAPHYtest 16) (3)

- 1. kmen: 703 651 = *S. aureus*, 99,8 %, Tin=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		

Úkol 7: Bližší určení stafylokoků pomocí biochemického mikrotestu (STAPHYtest 16) (4)

- 2. 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								
+	<input type="checkbox"/>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
-	<input type="checkbox"/>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
?	<input type="checkbox"/>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
		+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	
		1	2	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
		7			0			3			2			4			1	

Úkol 8a: Citlivost stafylokoků k antibiotikům

- **odečtete difusní diskový test – změřte zóny a porovnejte s referenčními zónami**
- máte k dispozici šestici antibiotik (FOX = cefoxitin, DA = klindmycin, 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).

Úkol 8a: Citlivost stafylokoků k antibiotikům – zóny citlivosti

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

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

Úkol 8b: Demontrace screeningové půdy na MRSA

- máte několik kmenů na speciální screeningové půdě pro MRSA (opakování z jarního semestru)
- **modré kolonie** jsou kolonie kmenů **MRSA**
- **jiné** (růžové či bílé kolonie) jsou **methicilin rezistentní kolonie jiných stafylokoků**, než je *S. aureus*
- **žádné kolonie** znamenají, že jde o **methicilin-citlivý kmen**

Po tomto cvičení byste měli umět:

- popsat základní vlastnosti rodu *Staphylococcus*
- jmenovat nejdůležitější druhy rodu, včetně nejčastějších infekcí, které způsobují
- popsat diagnostický proces, který vede k určení izolátů až na úroveň druhu
- popsat vztah virulenčních faktorů stafylokoků a nemocí, popř. průběhu nemocí (např. vztah koagulázy a abscesů atp.) a využití těchto vlastností při diagnostice
- použít mikroskopii naivního a fixovaného preparátu barveného Gramovým barvením v diagnostice
- vhodně použít různé kultivační půdy pro diagnostiku mikroorganismů