

## 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)<br><hr/> <hr/> <hr/> <hr/> |
|--|--|

### 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>                 |          |   |   |   |   |

*Pokud některý test u některého kmene neprovádíte, proškrtněte ho. Konečný závěr ale napište pro všechny.*

### Úkol 2: Mikroskopie kultur mikroorganismů

Obarvěte podle Grama čisté kultury předložených mikrobů. Výsledky pozorování zakreslete (↓) a запиšte (↑).

|        |        |        |        |
|--------|--------|--------|--------|
| Kmen K | Kmen L | Kmen M | Kmen N |
|        |        |        |        |

### Úkol 3: Růst na krevním agaru

Vyplňte tabulku na první straně v řádcích „Úkol č. 3“. Do „jiných“ napište to zajímavé, co se nevejde jinam.

### 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 vnesťte 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 v tabulce 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)

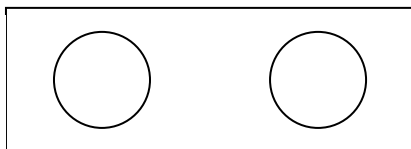
Na podložní skličku kápněte kapku ředěné králičí plazmy. Pomocí sterilní mikrobiologické kličky v ní suspendujte vyšetřovaný kmen stafylokoka. Přítomnost plasmakoagulázy se projeví aglutinací bakteriálních buněk. Výsledek vyšetření zakreslete a zapište sem i do tabulky.

Kmen \_\_\_\_\_

(písmeno)

pozitivní – negativní

(škrtněte co neplatí)



Kmen \_\_\_\_\_

(písmeno)

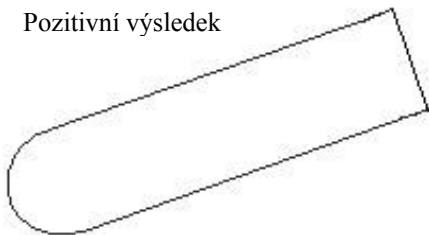
pozitivní – negativní

(škrtněte co neplatí)

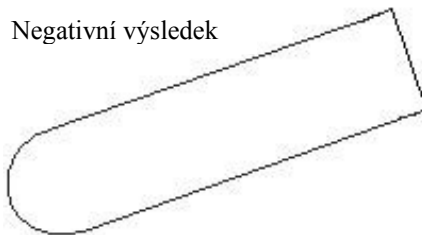
#### 6b) Plasmakoagulázový test (test volné plasmakoagulázy)

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. (Zkumavka je v nákresu záměrně nakloněná, aby bylo vidět, zda je uvnitř hladina tekutiny.)

Pozitivní výsledek



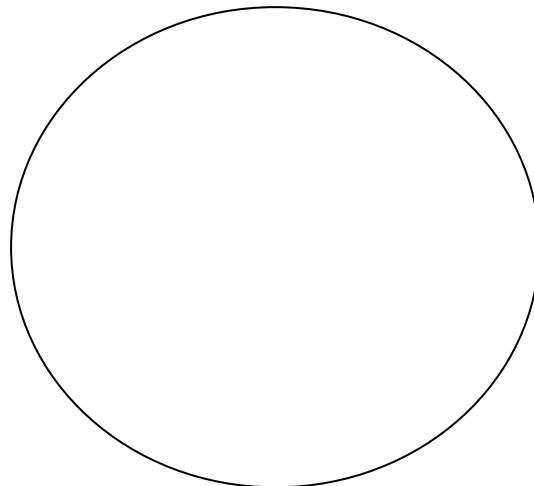
Negativní výsledek



#### 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 naočkováného *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: Blížejší určení stafylokoků pomocí biochemického mikrotestu (STAPHYtest 16)

Pro identifikaci stafylokoků je určena sada biochemických testů. Podle tabulky v návodu k použití nebo podle barevné srovnávací šablony odečtete výsledky jednotlivých reakcí. Výsledky testů pro jednotlivé kmeny запиšte a na základě interpretačních tabulek zjistíte, o které druhy stafylokoků jde. Začátek výsledků pro první kmen máte předvyplněn. Nezapomeňte vyplnit též procento pravděpodobnosti a index typičnosti!

|          | Zkum. | První řádek vlastního testu s 8 jamkami |    |    |    |    |    |    |    |                                       | Druhý řádek vlastního testu s 8 jamkami |    |    |              |    |    |         |  |
|----------|-------|---|----|----|----|----|----|----|----|---------------------------------------|---|----|----|--------------|----|----|---------|--|
|          | 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<br><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<br><i>Staphylococcus</i> |   |    |    | % pravděpod. |    |    | T index |  |

### Úkol 8: Citlivost stafylokoků k antibiotikům

Zjistíte citlivost předložených kmenů stafylokoků k vybraným antibiotikům, pomocí diskového difusního testu. Citlivost k předkládaným antibiotikům zhodnoťte na základě srovnání změřeného 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) запиšte. V případě, že zóna citlivosti není vůbec přítomna, proškrtněte průměr zóny a rovnou запиšte „R“.

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

\*zapisujte C = citlivý, R = rezistentní, případně D = dubiozní (hraniční zóna, velikost právě rovna referenční)

