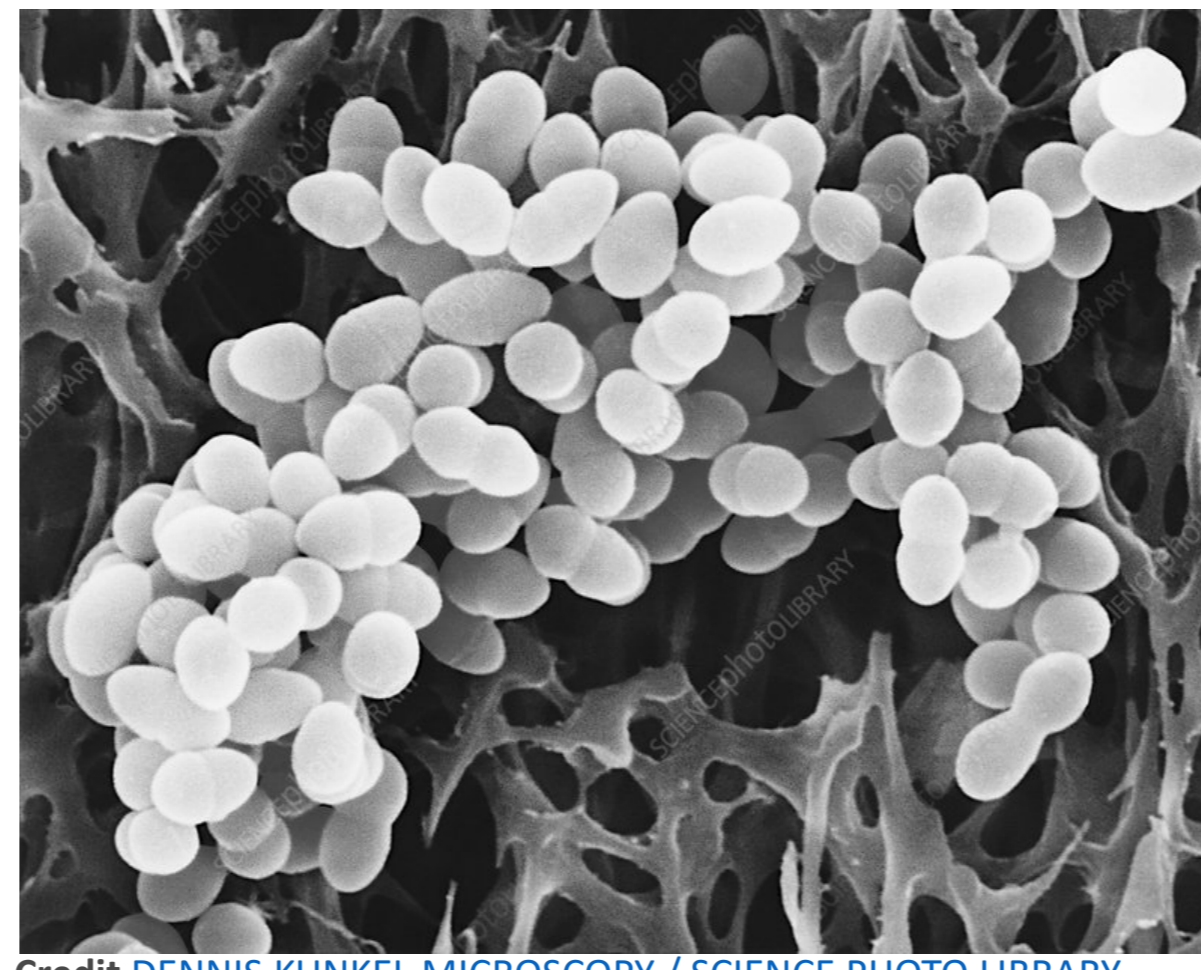


# Bakteriologická diagnostika veterinárně významných zástupců rodu *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou grampozitivní koky asi 1  $\mu\text{m}$  v průměru, které se formují do shluků v podobě hroznů. Jsou nepohyblivé, oxidáza negativní, nesporegenní, fakultativně anaerobní a kataláza pozitivní. Stafylokoky jsou poměrně stabilní v prostředí se selektivní afinitou pro určitý živočišný druh. Dosud bylo popsáno 55 druhů a 7 z nich tvoří koagulázu, která významně koreluje s jejich patogenitou. Druhy, které netvoří koagulázu mají nízkou virulenci, nicméně některé příležitostně vyvolávají infekce zvířat a člověka. Stafylokoky jsou vesměs původci hnisavých infekcí.

## Veterinárně významné druhy

- *Staphylococcus aureus* - dermatitidy, mastitidy, artritidy, septicémie
- *Staphylococcus hyicus* - osutina selat (exudativní dermatitida)
- *Staphylococcus intermedius* - sporadické infekce koní, holubů
- *Staphylococcus pseudintermedius* - hnisavé infekce (pes, kočka)
- *Staphylococcus delphini* - hnisavé dermatitidy delfinů, také koně a holubi
- *Staphylococcus schleiferi* susp. *coagulans* - zánět zevního zvukovodu psů



Credit DENNIS KUNKEL MICROSCOPY / SCIENCE PHOTO LIBRARY  
Snímek *S. aureus* ze skenovacího elektronového mikroskopu

## Faktory patogenity

- **Protein A**, kapsulární polysacharidy – interakce s imunitním systémem
- **Kataláza** – napomáhá k přežití ve fagocytech
- **Koaguláza** – chrání bakterii před fagocytujícími buňkami
- **Exoenzymy** (kinázy a hyaluronidázy) – podporují invazi do tkání
- **Exotoxiny** (hemolyziny a leukocidin) – lyzují stěnu hostitelské buňky
- **Exfoliativní toxiny** (proteázy) afinita k desmogleinu v kůži
- **Enterotoxiny** – alimentární intoxikace člověka, 21 typů (klasické A-E)
- **Superantigeny** – např. toxin syndromu toxického šoku (TSST – 1)

## POSTUP DIAGNOSTIKY

### Vzorky

- stěry změněných sliznic a kůže, změněné tkáně, sekrety z nehojících se ran, hnis, mléko, stěry z prostředí stájí a ambulancí (MRSA), potraviny ...



### Kultivace

- Základní kultivace na krevní a MacConkeyův agar
- Selektivní izolace na:
  - krevní agar s kyselinou nalidixovou a kolistinem (CN agar, inhibice G- bakterií)
  - manitolový slaný agar
  - Baird-Parkerův agar
  - selektivní agary pro MRSA

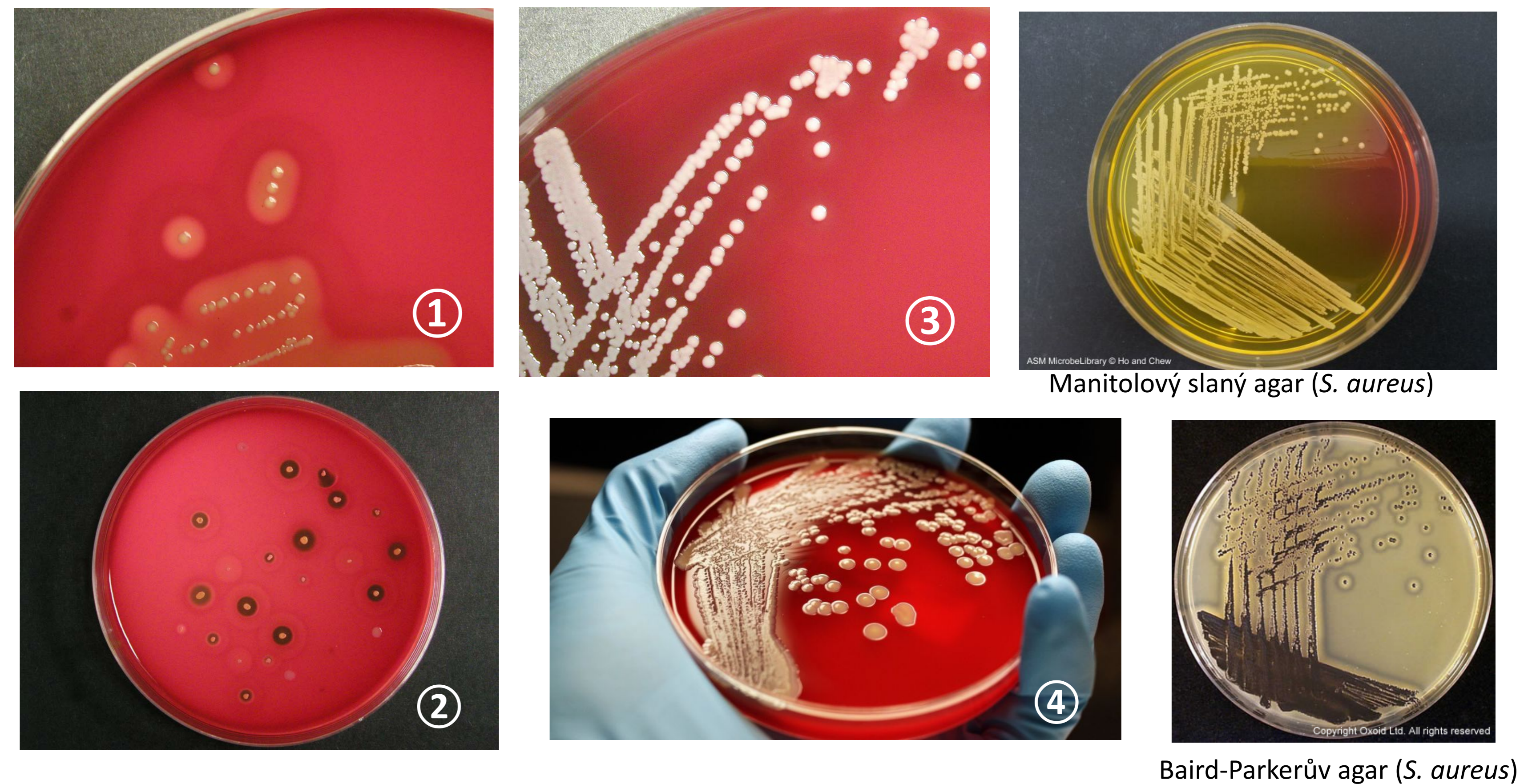
Inkubace při 37°C 24-48 hodin



## Identifikace

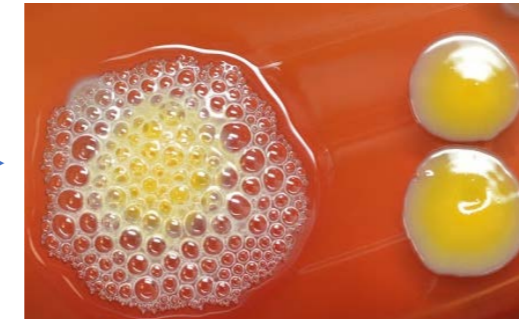
### Růstové vlastnosti stafylokoků - charakteristika kolonií

- Pigmentované ploché a neprůhledné kolonie, do 4 mm v průměru (závisí na stáří kultury) (obr. č. 4)
- kolonie s různými odstíny od porcelánově bílé do krémově žluté, *S. hyicus* má porcelánově bílé kolonie (obr. č. 3) a kolonie bovinních a lidských kmenů *S. aureus* bývají zlatavě žluté (obr. č. 4) častá i dvojitá hemolýza kolem kolonií (obr. č. 1, 2) (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*)
  - závisí na produkci hemolyzinů  $\alpha$  a  $\beta$  (společně působí dvojitou hemolýzu)
  - **$\alpha$  hemolyzin** způsobuje úzkou zónu **kompletní** hemolýzy přiléhající ke kolonii
  - **$\beta$  hemolyzin** způsobuje širší zónu **částečné** nebo **nekompletní** hemolýzy
  - oba hemolyziny najednou způsobují **dvojitou hemolýzu**



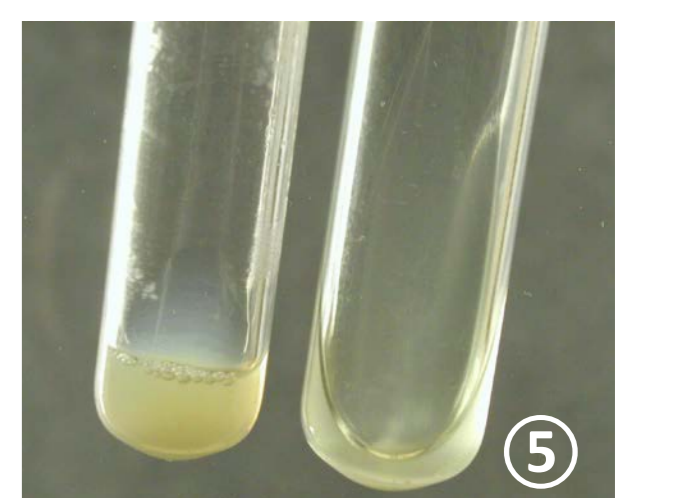
### Rychlý skrínig kultur

- Růst na krevním agaru a absence růstu na McConkeyově agaru
- Charakteristika kolonií (odlišení od mikokoků a dalších G+ koků)
- Hemolýza, často dvojitá
- Produkce katalázy
- Mikroskopie barveného preparátu



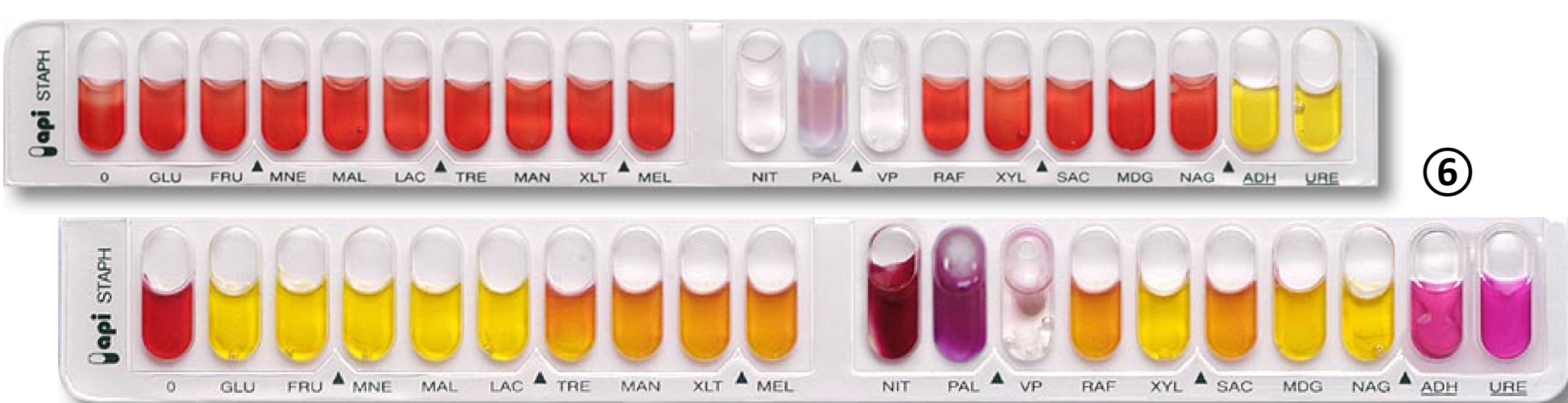
**Koagulázový test** - hodnotí produkci koagulázy při smíchání suspenze stafylokoků s králičí plazmou -> v pozitivním případě je koagulázou fibrinogen přeměněn na fibrin a dojde ke ztuhnutí

- **Skříčkový test** - pozitivní test se projeví jako shluk bakterií do 1-2 min.
- **Zkumavkový test** reakce se hodnotí za 24 hodin při 37°C (obr. č. 5)

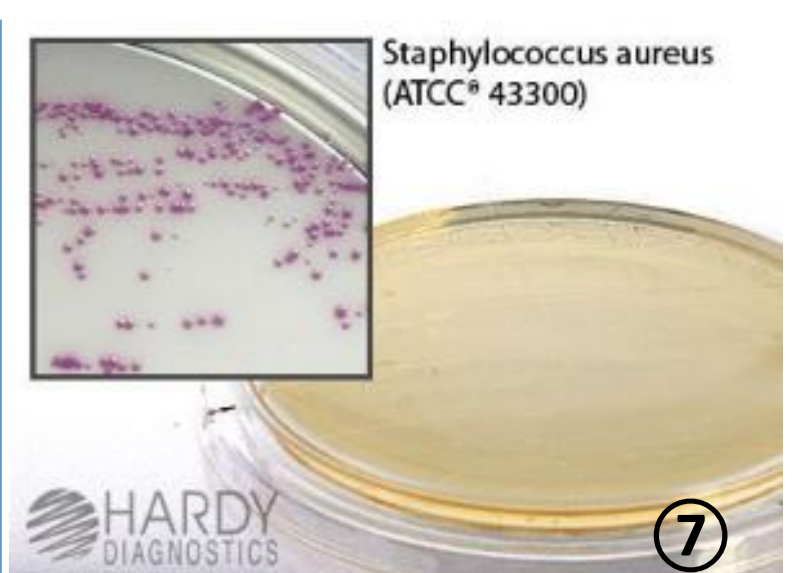


### Konečná identifikace je založena na zhodnocení:

- Biochemické aktivity některým z komerčních kitů (obr. č. 6)
- Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF
- Výsledků PCR (např. geny pro 16S RNA, aj.)



**Antibiogram** - zjištění fenotypu antibiotické rezistence se provádí diskovou difusní metodou nebo kvantitativně stanovením MIC (E testy, mikrodiluční testy). Průkaz epidemiologicky závažných typů rezistence u stafylokoků animálního původu, zejména meticilin rezistentní *S. aureus* (MRSA) vyžaduje speciální chromogenní média pro izolaci MRSA (obr. č. 7).



### Typizace kultur *S. aureus* pro epidemiologické účely (molekulární epidemiologie)

- Typizace zejména kmenů MRSA, např. *spa* typizace (variabilita genu pro protein A),
- Celogenomové sekvenování – identifikace SNPs (single nucleotide polymorphisms) a sekvenčních typů (velmi rozšířený ST398 označovaný jako LA-MRSA – livestock-associated)
- PCR – průkaz genů rezistence a genů kódujících tvorbu toxinů (enterotoxinů)