

Praktická úloha č. 2 (90 minút, 45 bodov)

Téma: Mikrobiológia – Identifikácia neznámej baktérie v lekárskej mikrobiológii

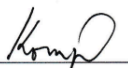
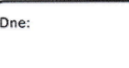
Pomôcky: permanentný popisovač (fixka), rukavice, utierky, 4x Pasteurova pipeta, 4x podložné sklíčko, 5x špáradlo, sklenená Petriho miska, 2x filtračný papier, roztoky na Gramovo farbenie označené A – D, kadička s destilovanou vodou, kadička na odpad, svetelný mikroskop, 0,5% roztok NaOH, 3% roztok peroxidu vodíka, pravítko, kalkulačka, Petriho miska s baktériami X, K1 a K2, automatické pipety a špičky.

Počas celej úlohy pracujte v laboratórnych plášťoch a s nasadenými rukavicami. **Odpovede vypĺňajte do odpovedového hárku – iba ten bude hodnotený.**

K identifikácii mikroorganizmov v biologických vzorkách využívajú laboratória lekárskej mikrobiológie široké spektrum metód, ktorými ich od seba odlišujú na základe morfológických, biochemických, antigénnych a rôznych ďalších vlastností. V tejto úlohe si niektoré z nich vyskúšate, keď budete pracovať diferenciálnym diagnostickým postupom, akým by mohlo pracovať aj laboratórium, ktorému príde vzorka od lekára. Počas úlohy budete pracovať výhradne s nepatogénnymi baktériami, ktoré ale majú niektoré vlastnosti spoločné s baktériami, ktoré by mohli spôsobovať infekcie.

*Pozn.: Vo viacerých úlohách sa vyžaduje farebné vyhodnotenie. Pokiaľ by ste mali problém s rozlišovaním farieb, upozornite na to vedúceho úlohy. Na vyskúšanie si porovnajte farbu týchto 2 slov: **fialová** x **ružová***

Nasimulujeme si nasledujúcu situáciu. Do laboratória vám prišla vzorka s touto žiadankou:

Kód poisťovny 1,1,1	požaduje číslo A	IČP 7,2,1,2,3,4,5,6 Odbornosť 9,8,7,2,9,0,3,2,5	Datum	Čís. dokladu	Pracovník Pracovník	Poř. č.																																																																																										
POUKAZ NA VYŠETŘENÍ / OŠETŘENÍ																																																																																																
Pacient Jozef Utrápený																																																																																																
C. poisťovne 2,0,0,6,1,5,3,2,1,0 Základní diagnóza																																																																																																
Var. symbol Ostatní diagnózy																																																																																																
Odeslán od:																																																																																																
Kód náhrady																																																																																																
Požadováno:																																																																																																
Výter z reznej rany na pravej hornej končatine na baktériologiu																																																																																																
Poznámka:																																																																																																
 razítko a podpis lékaře																																																																																																
Dne:  razítko a podpis																																																																																																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>IČP</th> <th>Odbornosť</th> <th>Var. symbol</th> <th>Datum</th> <th>Kód</th> <th>Poř.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>13</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>14</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>							IČP	Odbornosť	Var. symbol	Datum	Kód	Poř.	1						2						3						4						5						6						7						8						9						10						11						12						13						14					
IČP	Odbornosť	Var. symbol	Datum	Kód	Poř.																																																																																											
1																																																																																																
2																																																																																																
3																																																																																																
4																																																																																																
5																																																																																																
6																																																																																																
7																																																																																																
8																																																																																																
9																																																																																																
10																																																																																																
11																																																																																																
12																																																																																																
13																																																																																																
14																																																																																																



Výter na bakteriologiu sa vykonáva pomocou sterilného tampónu. Ten je pri transporte ponorený do transportného média (napr. Amiesovo) a v takejto podobe sa dostane do laboratória.

Mikroskopia:

Prvou metódou, ktorá sa štandardne vykoná, keď laboratóriu príde takáto vzorka, je mikroskopia. Tá poskytuje veľmi užitočné informácie ohľadom morfológie bunky. Pred samotným mikroskopovaním je ešte potrebné vzorku zafixovať a nafarbiť.

Úloha 1a: Zoberte si 2 nové podložné sklíčka a položte ich vedľa seba do prázdnej sklenenej Petriho misky. Na kraji (pri kratšej hrane) označte sklíčka svojim súťažným číslom a vedľa čísla napíšte na jedno sklíčko označenie K1 a na druhé označenie X. Do stredu každého sklíčka umiestnite pipetou kvapku destilovanej vody s objemom 10 μ l. Do tejto kvapky na podložnom sklíčku by sa rozsuspendovali baktérie, ktoré boli odobraté na tampóne. V našom prípade odoberte plochou stranou nového špáradla z Petriho misky zopár kolónii (stačí aj 1) baktérii označených písmenom K1 (kontrola) a opatrne ich rozsuspendujte v destilovanej vode na sklíčku K1. Pomocou špáradla rozotrite kvapku po povrchu sklíčka na čo najtenšiu vrstvu. Postup zopakujte aj pre neznámu vzorku označenú písmenom X. Počkajte približne 10 minút, kým na oboch sklíčkach tekutina zaschne. Po zaschnutí tekutiny prineste sklíčka v Petriho miske vedúcemu úlohy, aby vám ich zafixoval nad plynovým kahanom. Počas čakania si môžete preštudovať ďalšiu časť úlohy a odpovedať na doplňujúce otázky.

Po zafixovaní preparátu a vychladnutí sklíčka (stačí počkať približne 1 minútu) môžete pokračovať farbením. K farbeniu využijete metódu podľa Grama, ktorá nám zároveň rozdeľuje baktérie do 2 skupín: grampozitívne (G+) a gramnegatívne (G-).

Úloha 1b: Ofarbite preparáty nasledujúcim postupom:

1. Vyberte z Petriho misky sklíčko K1 a položte ho na stôl na filtračný papier.
2. Pomocou Pasteurovej pipety kvapnite niekoľko kvapiek roztoku A (maximálne polovicu celého objemu v skúmavke) na sklíčko tak, aby ste ním zaliali baktérie a počkajte 30 sekúnd. Na odstopovanie použite časovač, ktorý je premietaný na stene.
3. Opláchnite vzorku vodou nad kadičkou označenou ako odpad pomocou Pasteurovej pipety, ktorá v nej bola ponorená na začiatku úlohy.
4. Rovnakým spôsobom kvapnite na vzorku roztok B a počkajte 30 sekúnd.
5. Opláchnite vzorku vodou.
6. Kvapnite na vzorku takisto roztok C na 15 – 20 sekúnd.
7. Opláchnite vzorku vodou tak, aby ste dôkladne vymyli všetok roztok C. Dávajte ale pozor, aby ste nezmyli popis na sklíčku, ak sa tak stane, napíšte ho ešte raz.
8. Kvapnite na vzorku roztok D na 60 sekúnd.
9. Opláchnite vzorku vodou.
10. Osušte sklíčko opatrne filtračným papierom tak, aby ste z neho nezotreli vzorku.
11. Odložte sklíčko do Petriho misky a zopakujte postup aj pre vzorku X.

Do odpovedového hárku odpovedzte na doplňujúce otázky:

Úloha 2: Pri Gramovom farbení využívame fakt, že bakteriálne bunky majú na povrchu bunkovú stenu. Ktorá/-é z nasledujúcich štruktúr sa takisto môže/-u vyskytovať u bakteriálnej bunky?

- A. Jadro
- B. Mitochondrie
- C. Ribozómy

D. Bičik

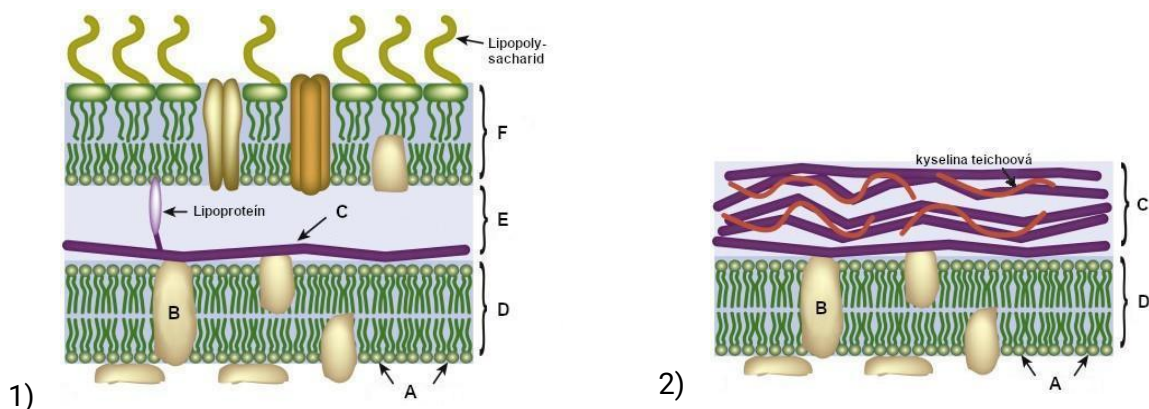
Úloha 3: Priradte jednotlivým roztokom z úlohy 1b ich správny názov:

- I. Lugolov roztok (roztok elementárneho jódu a jodidu draselného)
- II. Kryštálová violet
- III. Alkohol
- IV. Safranín / karbolfuchsin

Úloha 4: Do tabuľky v odpovedovom hárku označte krížikom, ktoré z daných tvrdení o Gramovom farbení je / sú pravdivé:

- A. Bunky, ktoré sa farbja načerveno, označujeme ako gramnegatívne.
- B. Grampozitívne baktérie majú komplexnejšiu bunkovú stenu, vďaka čomu sú odolnejšie voči ľudským obranným systémom, akým je napríklad enzým lyzozým.
- C. Komplex, ktorý vzniká v bunkách po premytí roztokmi A a B u grampozitívnych baktérii nedokážeme vymyť roztokom C, vďaka zloženiu ich bunkovej steny.
- D. Vďaka zloženiu bunkovej steny gramnegatívnych baktérii sa roztoky A, B ani C nedostanú do bunky a ofarbia sa až roztokom D.

Úloha 5: Priradte obrázkom bunkových stien skupinu baktérii, ku ktorej patria (do tabuľky doplňte G+ alebo G-):



Úloha 6: Priradte štruktúram na obrázkoch vyššie ich správny názov:

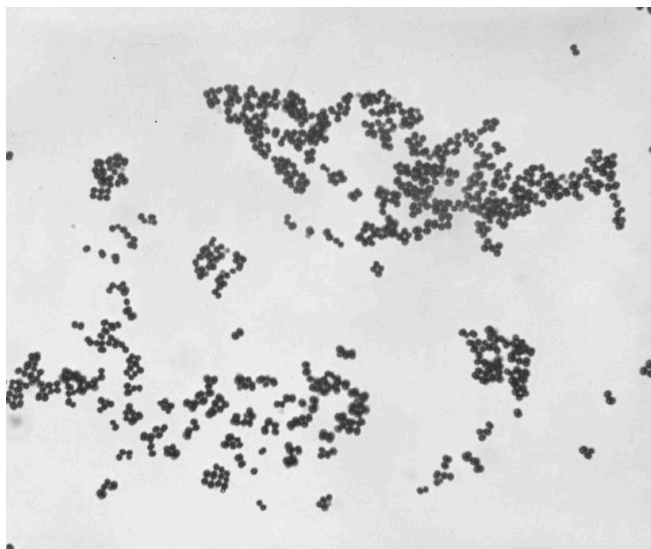
- I. Vnútorná membrána
- II. Vonkajšia membrána
- III. Periplazmatický priestor
- IV. Fosfolipidy
- V. Proteín
- VI. Peptidoglykán

V ďalšom kroku sa vykoná samotná mikroskopia.

Úloha 7: Zoberte sklíčka, ktoré ste farbili v predošlej časti. Keďže sa jedná o fixovaný preparát, nie je nutné použiť krycie sklíčko a môžete ich priamo vložiť do mikroskopu. Pozorujte baktérie v objektíve so zväčšením 40x. Po dokončení mikroskopovania odložte sklíčka v Petriho miske na stôl a uveďte mikroskop do pôvodného stavu. Do odpovedového hárku zaznačte pre každú vzorku, či sa jedná o G+ alebo G- baktérie.

Na pozorovanie väčších detailov, ako je tvar a usporiadanie baktérií, je zväčšenie, ktoré sme schopní dosiahnuť našimi mikroskopmi, nedostačujúce. V praxi sa najčastejšie využívajú

objektívy so zväčšením 100x. Na obrázku nižšie môžete vidieť, ako by vyzeral preparát X v takomto zväčšení.



Pozn.: Obrázok je zámerne čiernobiely.

Úloha 8: Vyberte z daných možností, aký je tvar a prevažujúce usporiadanie baktérií:

- A. Guľovité baktérie v zhlukoch
- B. Guľovité baktérie v retiazkach
- C. Guľovité baktérie izolovane
- D. Kokobacily izolovane

Gram-lytický test:

Alternatívu ku Gramovmu farbeniu predstavuje Gram-lytický test, ktorým od seba takisto odlíšime grampozitívne a gramnegatívne baktérie. U jednej z týchto skupín baktérií dochádza po ponorení do hydroxidu k rozkladu, pri ktorom sa z bunky uvoľní ich DNA. Uvoľnená DNA výrazne zvýši viskozitu roztoku, čo sa okrem iného prejaví aj vznikom tenkých vlákien pri oddaľovaní špáradla, ktoré bolo ponorené v tomto roztoku.

Úloha 9: Na nové podložné sklíčko kvapnite 2 kvapky po 10 µl 0,5% hydroxidu sodného (NaOH). Dbajte na to, aby boli kvapky od seba dostatočne vzdialené. Označte kvapky na sklíčku značkami K2 pre pozitívnu kontrolu a X pre našu neznámu vzorku. Pomocou tupého konca nového špáradla odoberte menšie množstvo kolónií na Petriho miske z časti označenej K2. Buďte ale opatrní, aby ste pri odoberaní nenabrali aj agar, na ktorom baktérie rástli. Ponorte špáradlo s baktériami do kvapky K2 a jemným pohybom ich v tejto kvapke rozpúšťajte približne 2 minúty. Počas toho sledujte, ako sa postupne zvyšuje viskozita. Počas miešania skúšajte jemne oddialiť špáradlo z roztoku a sledujte, ako sa medzi roztokom a špáradlom naťahuje tenké vlákno. Takto vyzerá pozitívna reakcia. Opakujte postup aj pre baktérie z neznámej vzorky X z Petriho misky. Pokiaľ sa vám pokus nepodarí, môžete ho zopakovať aj viackrát. Ak by ste potrebovali doplniť materiál (špáradlá, podložné sklíčka), požiadajte o to vedúceho úlohy. Do odpovedového hárku odpovedzte na nasledujúce otázky:

- a) Reakcia pre vzorku X prebehla rovnako ako v prípade pozitívnej kontroly – áno / nie

- b) Na základe výsledkov z mikroskopovania vzorky X vyplýva, že Gram-lytický test je pozitívny u baktérií – grampozitívnych / gramnegatívnych

Katalázový test:

Na základe výsledku z úlohy 8 by sme mohli predpokladať, že sa v neznámej vzorke nachádzajú stafylokoky. Zatiaľ čo tvar baktérii dokážeme z mikroskopu určiť pomerne spoľahlivo, určovať baktérie na základe ich usporiadania môže byť často nepresné. Preto je potrebné si to overiť ďalšími testami. Zo skupiny baktérii, ktoré majú tvar označený v úlohe 8, pripadajú do úvahy 3 lekárske najdôležitejšie rody: *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*. Stafylokoky od zvyšných dvoch odlíšime na základe biochemického testu, ktorý zisťuje, či baktérie produkujú enzým katalázu.

Úloha 10: Na nové podložné sklíčko kvapnite 20 μ l 3% roztoku peroxidu vodíka. Novým špáradlom odoberte zopár kolónií kmeňa X z Petriho misky a rozmiešajte ho v tejto kvapke. V prípade produkcie katalázy baktériami sa okamžite objavia v roztoku bublinky a reakcia je pozitívna. Výsledok zaznamenajte do odpovedového hárku.

Úloha 11: Kataláza je enzým, ktorý premieňa peroxid vodíka na 2 produkty, pričom v jednom prípade sa jedná o plyn, ktorý je u pozitívnej reakcie pozorovaný ako bublinky. Ktoré 2 produkty vznikajú pri tejto reakcii?

- A. $H_2 + O_2$
- B. $H_2O + CO_2$
- C. $H_2O + O_2$
- D. $H_2O_2 + CO$

Kultivácia:

Okrem mikroskopie má v mikrobiológii nezastupiteľnú úlohu kultivácia. Vzorky, ktoré prídu do laboratória sa rozočkujú na niekoľko pôd, ktoré odlišia baktérie na základe ich kultivačných vlastností. V našom prípade by pri preukazovaní stafylokokov mala najväčší význam selektívna pôda s 10% NaCl, keďže stafylokoky ako jediné z významných baktérií obývajúcich ľudské telo sú schopné rásť aj v takýchto podmienkach.

Úloha 12: Akú evolučnú výhodu predstavuje vlastnosť stafylokokov, ktorú preukazujeme rastom na tejto pôde?

- A. Umožňuje im rásť v hyperosmotických podmienkach, aké sa nachádzajú aj na ľudskej koži.
- B. Umožňuje im rásť v hypoosmotických podmienkach, aké predstavuje napríklad morská voda.
- C. Umožňuje im rásť v kyslom prostredí, vďaka čomu prežijú cestu žalúdkom.
- D. Umožňuje im rásť v redukčných podmienkach, vďaka čomu prežívajú v anaeróbnom prostredí.

Koagulázový test:

S použitím metód v predošlej časti sme zistili, že sa jedná o stafylokoky. Z lekárskeho hľadiska má veľký význam vedieť, či sa jedná o patogénny *Staphylococcus aureus* alebo iné stafylokoky, ktoré súhrnne označujeme ako koaguláza negatívne stafylokoky. Tieto stafylokoky sú naopak bežnou súčasťou kožnej mikroflóry a ich nález v biologickej vzorke často znamená len kontamináciu pri nesprávnom odoberaní vzorky.

Na odlíšenie sme využili koagulázový test. Kmene *S. aureus* produkujú ako jediný enzým viazaný koagulázu a bunky týchto kmeňov obsahujú takisto ako jediný proteín A. Na latexových časticiach komerčne vyrábaného koagulázového testu je naviazaný králičí imunoglobulín (IgG) a fibrinogén. Pri reakcii koagulázy s fibrinogénom alebo proteínu A s IgG dôjde k jasnej aglutinácii latexovej suspenzie.

Úloha 13: Na podložné sklíčko bola urobená jedna kvapka latexovej suspenzie roztoku ANTI *S. AUREUS*. Priloženým miešadlom sa nabralo asi 5 kolónií testovaného kmeňa X a dobre sa rozmiešali v latexovej suspenzii. Sklíčkom sa kolísalo po dobu jednej minúty. Výsledok reakcie je znázornený na jednom z týchto obrázkov:

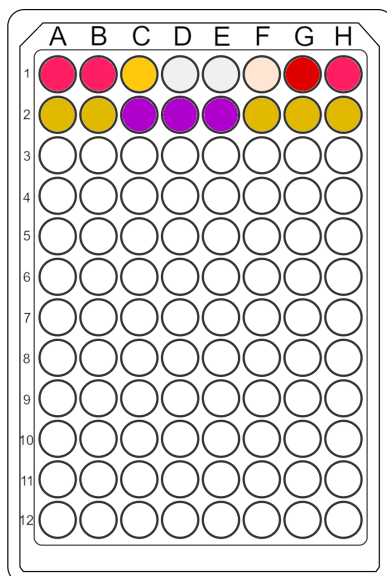


V pozitívnom prípade (reakcia koagulázy s fibrinogénom alebo proteínu A s králičím IgG) dochádza do jednej minúty k zreteľnej aglutinácii latexovej suspenzie. Aglutinácia znamená tvorbu voľným okom viditeľných zrníčok, medzi ktorými je tekutina viac či menej prejasnená. V negatívnom prípade k aglutinácii latexovej suspenzie do jednej minúty nedôjde. Označte, ktorý z daných obrázkov znázorňuje reakciu pre neznámy kmeň X, ak viete, že nepracujete s patogénnym *S. aureus*.

Diagnostické súpravy:

V prípade, že sa nejedná o *S. aureus*, si vo väčšine prípadov vystačíme so záverom, že sa jedná o koaguláza negatívneho stafylokoka. Pokiaľ by sme chceli bližšie určiť, o aký druh stafylokoka sa jedná, odlíšime ich na základe biochemických vlastností. Jeden biochemický test sme si už ukázali, keď sme preukazovali produkciu katalázy. Bolo by náročné, vykonávať podobným spôsobom väčší počet ďalších testov, aby sme sa dostali až k hľadanému druhu. Z toho dôvodu sa komerčne vyrábajú testy v plastových paneloch. Jedná sa o doštičky, ktoré obsahujú v jednotlivých jamkách rôzne lyofilizované substráty. Do jamiek sa potom pridá suspenzia baktérii vo fyziologickom roztoku alebo v dodanom suspenznom médiu a po inkubácii sa sleduje, či došlo k štiepeniu substrátov a zmene farby v jednotlivých jamkách.

Jedným z takýchto testov je STAPHYtest16 (od Erba Lachema). Ten umožňuje identifikovať 60 kmeňov pomocou 16 biochemických testov, ktoré sú umiestnené v mikrotitračných doštičkách v 2 radoch po 8 jamkách. Na tejto schéme môžete vidieť, ako by vyzeral výsledok testu pre náš laboratórny kmeň:



Test sa dá vyhodnotiť niekoľkými spôsobmi. My si ho vyhodnotíme na základe identifikačnej tabuľky dodávanej spolu s testom.

Interpretácia reakcií

Stĺpec	Test	Skratka a testu	Reakcia	
			Pozitívne	Negatívne
Riadok 1				
A	Ureáza	URE	Červenofialová, oranžovočervená	Žltá, svetlo oranžová
B	Arginín	ARG	Červenofialová, červená	Žltá, svetlo oranžová
C	Ornitín	ORN	Červenofialová, červená	Žltá, svetlo oranžová
D	β-Galaktozidáza	bGA	Žltá, svetlo žltá	Bezfarebná, zákal suspencie
E	β-Glukuronidáza	GLR	Žltá, svetlo žltá	Bezfarebná, zákal suspencie
F	Eskulín	ESL	Čierna, tmavo hnedá	Bezfarebná, nahnedlá
G	Nitráty	NIT	Tmavo červená, červená	Bezfarebná, naružovelá
H	Fosfatáza	PHS	Červenofialová	Bezfarebná, svetlo ružová
Riadok 2				
A	Galaktóza	GAL	Žltá, žltohnedá	Fialová, šedofialová
B	Sacharóza	SUC	Žltá, žltohnedá	Fialová, šedofialová
C	Trehalóza	TRE	Žltá, žltohnedá	Fialová, šedofialová
D	Mannitol	MAN	Žltá, žltohnedá	Fialová, šedofialová
E	Xylóza	XYL	Žltá, žltohnedá	Fialová, šedofialová
F	Maltóza	MLT	Žltá, žltohnedá	Fialová, šedofialová
G	Mannóza	MNS	Žltá, žltohnedá	Fialová, šedofialová
H	Laktóza	LAC	Žltá, žltohnedá	Fialová, šedofialová

Identifikačná tabuľka (skrátená verzia)

Riadok 1								Riadok 2								
A UR E	B AR G	C OR N	D BG A	E GL R	F ES L	G NIT	H PH S	A GAL	B SU C	C TR E	D MA N	E XY L	F ML T	G M NS	H LA C	
-	-	-	(d)	+	(d)	-	(d)	(+)	+	+	+	+	+	(d)	+	Staphylococcus arlettae
-	(d)	-	(-)	-	-	+	-	-	(d)	+	-	-	(d)	-	-	Staphylococcus auricularis
+	+	-	-	-	-	+	+	+	(d)	+	+	-	+	(+)	+	Staphylococcus caprae
+	+	-	(d)	-	-	+	+	+	+	+	(-)	-	(d)	+	+	Staphylococcus chromogenes
+	+	-	-	-	-	+	+	(d)	+	-	+	-	+	+	+	Staphylococcus delphini
+	(d)	(-)	(-)	-	-	+	(+)	(+)	+	-	-	-	+	(d)	(+)	Staphylococcus epidermidis
+	-	-	(d)	+	+	+	(d)	+	+	+	+	+	+	+	(d)	Staphylococcus equorum
+	+	-	(+)	-	-	+	+	(+)	(d)	+	(+)	-	-	+	+	Staphylococcus felis
+	-	-	(d)	(d)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(d)	Staphylococcus gallinarum
-	+	-	(-)	(-)	-	+	-	D	+	+	(d)	-	+	-	(d)	Staphylococcus haemolyticus
(d)	+	-	-	(+)	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	Staphylococcus hyicus
+	(d)	-	+	-	-	+	+	+	+	+	(d)	-	(d)	+	(+)	Staphylococcus intermedius
(d)	-	-	(d)	(d)	(d)	-	+	(d)	-	+	+	(-)	+	-	(d)	Staphylococcus kloosii
-	-	-	(d)	-	+	+	(-)	+	+	+	+	(d)	(d)	+	(+)	Staphylococcus lentus
(d)	-	+	(-)	-	-	+	-	(d)	+	+	-	-	+	+	+	Staphylococcus lugdunensis
-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	Staphylococcus muscae
+	(d)	-	-	+	-	(d)	-	-	+	+	(+)	-	(+)	-	(d)	Staphylococcus pasteuri
+	+	-	-	-	+	+	(d)	(d)	(d)	+	(d)	-	(d)	-	(d)	Staphylococcus piscifermentans
+	+	-	+	(d)	-	+	(-)	-	+	+	(+)	-	(d)	(+)	+	Staphylococcus simulans
+	(d)	-	(-)	(+)	-	(d)	-	(-)	+	+	(d)	-	+	-	(-)	Staphylococcus warneri
+	-	-	(+)	+	(-)	(+)	(-)	+	+	+	+	+	+	+	(d)	Staphylococcus xylosus
-	-	-	(-)	-	+	+	-	+	+	+	-	-	(d)	(+)	-	Stomatococcus mucilaginosus
-	-	-	-	-	(d)	+	-	-	+	(d)	+	(d)	-	-	-	Staphylococcus vitulinus
+	+	-	+	-	-	+	+	+	(d)	+	+	-	-	+	+	Staphylococcus condimenti
+	-	-	+	-	-	+	+	+	(d)	+	(d)	+	+	+	+	Staphylococcus lutrae
+	+	-	(-)	-	-	+	-	(-)	+	+	(-)	-	+	+	(-)	Staphylococcus petraei

Vysvetlivky: + = 90 – 100% pozitívnych reakcií, (+) = 75 – 89% pozitívnych reakcií, (d) = 26 – 74% pozitívnych reakcií, (-) = 11 – 25% pozitívnych reakcií, - = 0 – 10% pozitívnych reakcií

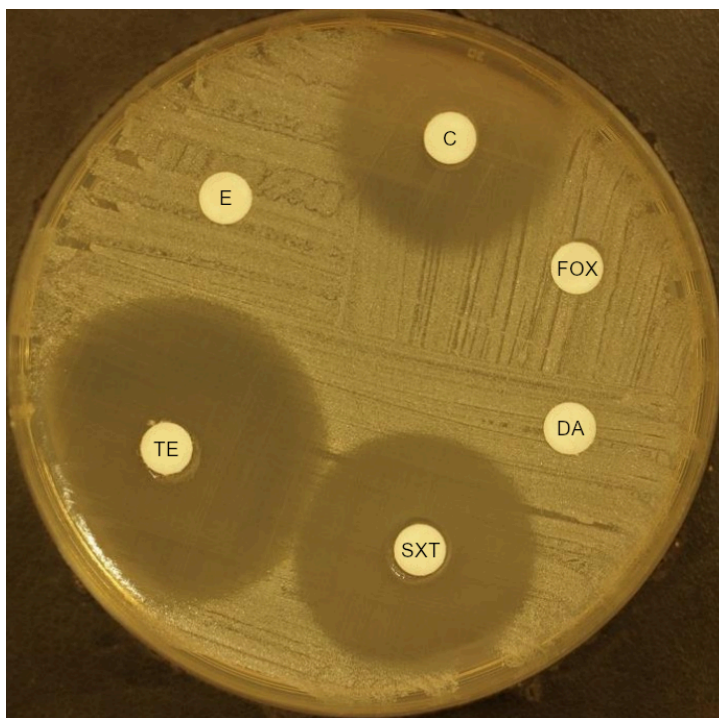
Úloha 14: S využitím identifikačnej tabuľky určte, o aký druh stafylokoka sa jedná.

Test na citlivosť antibiotík:

V prípade prítomnosti patogénneho *S. aureus* musí nasledovať liečba antibiotikami. Prvou voľbou pri klasických stafylokokových infekciách je antibiotikum oxacilín. V súčasnosti sa však pomerne často stretávame s rezistentnými kmeňmi. Aby lekár vedel, ktoré antibiotikum môže pri liečbe využiť, potrebuje vedieť, na ktoré antibiotiká je daný kmeň citlivý a naopak, na ktoré je rezistentný. Z toho dôvodu vykonávajú laboratória takisto testy na citlivosť na antibiotiká.

Najjednoduchším kvantitatívnym testom citlivosti je difúzny diskový test. Baktérie sa naočkujú na kultivačnú pôdu, na ktorú sa umiestni niekoľko diskov obsahujúcich antibiotiká. Antibiotiká difundujú do tejto pôdy a tak sa vytvorí koncentračný gradient. Pokiaľ koncentrácia antibiotika prekročí tzv. minimálnu inhibičnú koncentráciu (MIC), baktérie na danom mieste nevyrastú.

Úloha 15: Nižšie môžete vidieť odfotenú kultivačnú pôdu s difúznym diskovým testom pre *S. aureus*. Pre každé antibiotikum sa odmeria priemer zóny okolo disku, v ktorej nevyrástli žiadne baktérie. Pokiaľ nie je okolo disku prítomná žiadna zóna, udáva sa hodnota 6 mm, čo je priemer samotného disku. Hodnoty, ktoré sa namerajú, sa porovnávajú s hraničnými hodnotami (tzv. breakpointmi) - priemer zóny okolo antibiotika, kedy koncentrácia na hranici zóny dosahuje hodnoty najvyššej koncentrácie, ktorú sme schopní dosiahnuť v tele pacienta bez toho, aby na neho pôsobilo antibiotikum toxicky. Pokiaľ je nameraná zóna blízko hraničnej hodnoty (± 1 mm), udáva sa citlivosť ako intermediárna. Pomocou pravítka odmerajte priemer zón okolo jednotlivých antibiotík. Keďže sa jedná iba o obrázok, prepočítajte hodnoty na rozmery, ktoré by mali zóny v skutočnosti, ak viete, že priemer každého disku je 6 mm. Podľa tabuľky pod obrázkom následne určte, na ktoré antibiotiká je daný kmeň *S. aureus* citlivý (C), na ktoré je intermediárne citlivý (I) a na ktoré rezistentný (R).



Antibiotikum	Skratka	Hraničná hodnota
Cefoxitín*	FOX	22 mm
Erytromycín	E	19 mm
Klindamycín	DA	20 mm
Kotrimoxazol	SXT	16 mm
Tetracyklín	TE	20 mm
Chloramfenikol	C	18 mm

*interpretuje sa ako oxacilín, prípadne aj ďalšie betalaktámy

Odoslanie výsledkov

Úloha vášho laboratória by bola v tomto prípade hotová. Lekárovi by ste spätne odoslali výsledok, aký mikroorganizmus ste identifikovali a prípadne by ste ho doplnili o výsledky testu na citlivosti. Lekár by na základe vašich výsledkov rozhodol o ďalšom postupe.

KONIEC PRAKTICKEJ ÚLOHY