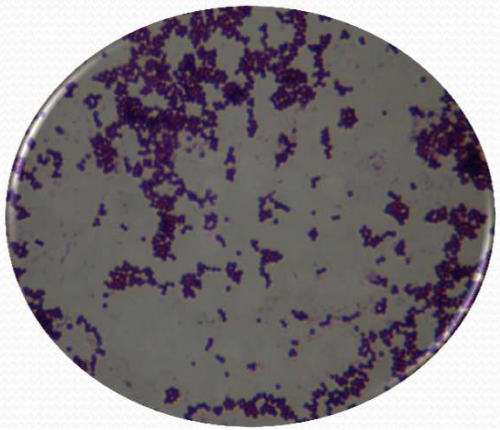
Staphylococcus spp.

Rod *Staphylococcus*

- Gram pozitivní koky ve shlucích
  - Lze pozorovat dvojice, čtveřice či krátké řetízky
- Nepohyblivé
- Nesporulující
- Fakultativně anaerobní
- Kataláza pozitivní
- Oxidáza negativní
  - Výjimka *Staph. sciuri*
- Rostou v přítomnosti 10% NaCl
- 52 druhů - 2 skupiny
  - Koaguláza pozitivní
  - Koaguláza negativní



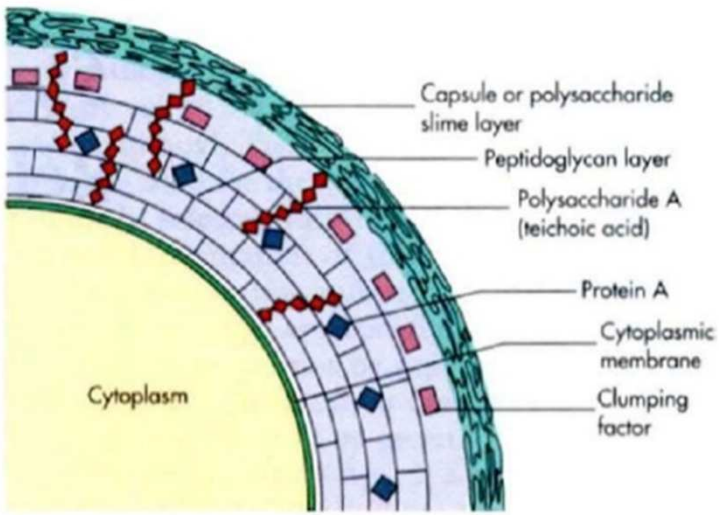
Staphylococcus aureus – Gramovo barvení

Koaguláza pozitivní stafylokoky

- *Staph. aureus*
  - *Staph. aureus* subsp. *aureus*
  - *Staph. aureus* subsp. *anaerobius*
    - U člověka se nevyskytuje
- *Staph. intermedius*
  - Výskyt u zvířat - pokousání

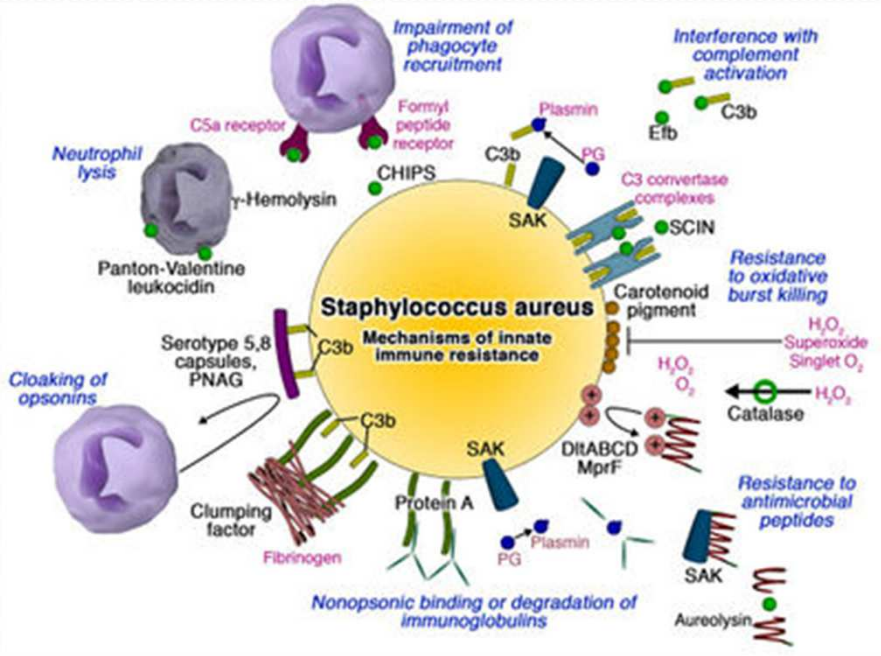
Staph. aureus

- Komensál na kůži a sliznicích
- Podmíněný patogen
- Antigenní struktura
  - Peptidoglykan
  - Protein A
  - Kapsulární antigeny
    - 11 antigenních typů
    - ➢ Zábrana fagocytóze



Staph. aureus

- Faktory virulence
  - Povrchové
    - Povrchové struktury
    - Povrchové proteiny
  - Extracelulární
    - Enzymy
    - Toxiny



Staph. aureus

- Faktory virulence - povrchové
  - Peptidoglykan
    - Účinek podobný endotoxinu
    - ➢ Aktivace komplementu, shlukování ery, produkce cytokinů
  - Protein A
    - Druhově specifický
    - Složen z kyseliny teichoové a ribitolových podjednotek
    - ➢ Adherence na sliznice a tkáně (vazba na fibronektin)
    - ➢ Nespecifická vazba s Fc-fragmentem imunoglobulinů (ochrana před opsonizací)
  - Vázaná koaguláza (clumping faktor)
    - Přeměna fibrinogenu na fibrin
    - ➢ Shlukování stafylokoků

Staph. aureus

- Faktory virulence - extracelulární
  - Enzymy
    - Koaguláza volná
      - Přeměna fibrinogenu na fibrin
      - ➢ Tvorba ohraničeného ložiska
    - Kataláza
      - Štěpí toxický peroxid vodíku
    - Hyaluronidáza
      - Štěpí kys. hyaluronovou
      - ➢ Průnik do tkáně
    - Lipáza
      - Rozkládá tuky
      - ➢ Průnik do mazových žláz a podkožní tkáně

Staph. aureus

- Faktory virulence - extracelulární
  - Enzymy
    - Nukleázy
      - Hydrolyzuje fosfodiesterové vazby NK
      - ➢ Pravděpodobně rozklad jader leukocytů
    - Fibrinolyzin (stafylokináza)
      - Štěpí fibrin
      - ➢ Fibrinolýza
    - Penicilináza
      - Rozklad beta-laktamového kruhu
      - ➢ Inaktivace beta-laktamových ATB

Staph. aureus

- Faktory virulence - extracelulární
  - Toxiny
    - Cytolyziny (hemolyziny)
      - Poškozují povrchovou membránu buněk
      - 4 hemolyziny a leukocidin
    - Enterotoxiny
    - Toxin syndromu toxického šoku
    - Exfoliativní toxiny

Staph. aureus

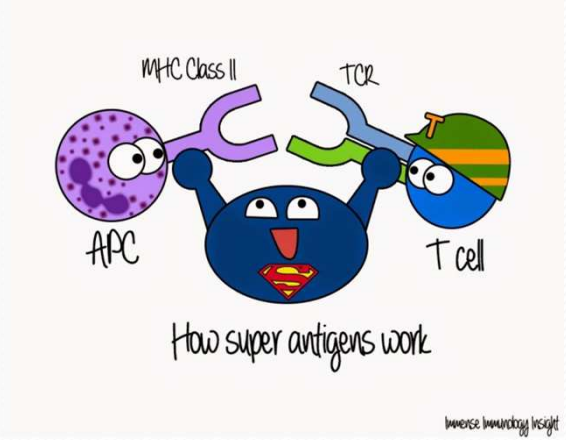
- Faktory virulence - extracelulární
  - Toxiny
    - Cytolyziny
      - *Alfa-hemolyzin*
        - In vivo – dermatonekrotický a letální
        - In vitro – beta-hemolýza
      - *Beta-hemolyzin* (sfingomyelinasa C)
        - In vivo – poškození tkáně, tvorba abscesů
        - In vitro – beta-hemolýza indukcí (chladem, CAMP-faktor)
          – inhibuje beta-hemolýzu *alfa-hemolyzinu*
      - *Gama-hemolyzin*
        - In vivo – vyšší hladina protilátek u osteomyelotid
        - In vitro – inhibován agarem
      - *Delta-hemolyzin*
        - In vivo – výrazně působí na lidské ery
        - In vitro – inhibiván lipoproteiny krevního séra → mylně nehemolytický
          – synergismus s *beta-hemolyzinem*
      - Pantonův-Valentinův leukocidin
        - Tvorba pórů v membráně neutrofilů a makrofágů
        - Uplatnění v patogenezi závažných infekcí kůže

Staph. aureus

- Faktory virulence - extracelulární
  - Toxiny
    - Enterotoxiny (A-E, G-R)
      - Termostabilní a acidorezistentní
      - Stafylokoková enterotoxikóza - nejčastěji enterotoxin A
      - Pseudomembranózní enterokolitida- enterotoxin B (nemocniční kmeny)
      - Ranné infekce - superantigen
    - Toxin syndromu toxického šoku
      - Superantigen
      - Zvyšuje permeabilitu endotelií a zesiluje účinek endotoxinu
    - Exfoliatiny
      - Čtyři druhy
      - Nejčatěji ET-A, ET-B
      - Proteolytické, rozpouštějí mukopolysacharidovou matrix v epidermis

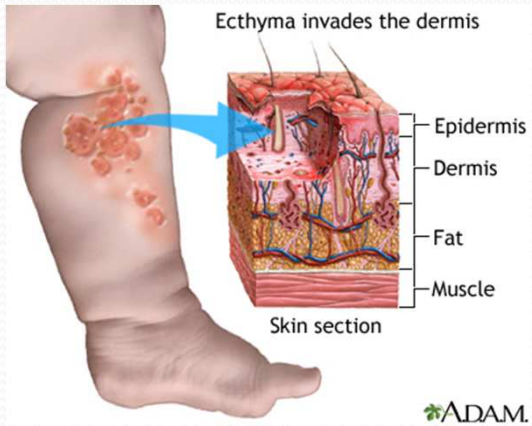
Staph. aureus

- Superantigen
  - Dvě vazebná místa
    - První - vazba na β doménu MHC II. třídy
    - Druhý – vazba na V oblast β domény TCR
  - Aktivace vysokého počtu T lymfocytů
    - Sekrece cytokinů
  - Zesílení účinku endotoxinů



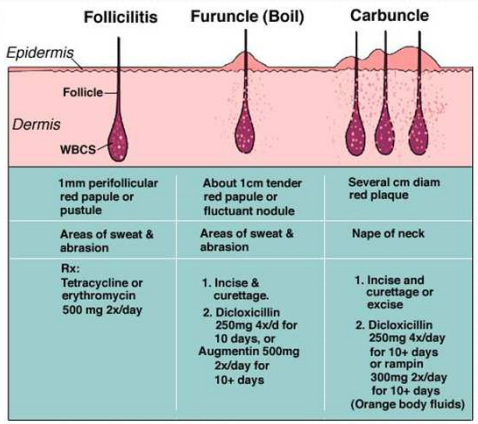
Staph. aureus

- Impetigo
  - Výskyt malé děti
  - Tvorba puchýřů v epidermis, žlutý hnis, žluto-hnědá krusta
- *Ecthyma*
  - Zasahuje do dermis



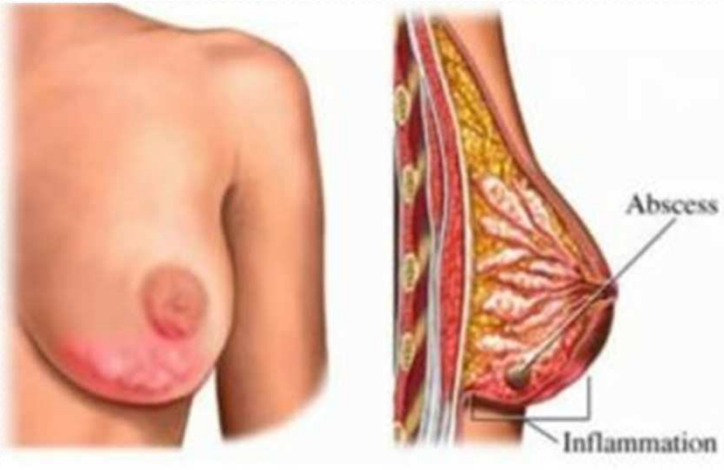
Staph. aureus

- Folikulitida
  - Hnisavá infekce vlasového míšku
  - Žlutavá pustulka se zarudlým okolí
- *Sycosis barbae*
  - Chronická splývající folikulitida ve vousaté části
- Furunkl
  - Rozšíření zánětu foliklu – kožní absces
- Karbunkl
  - Mnohočetné furunkly
  - Výskyt zejména na šíji
- Hidradenitida
  - Zánět potních žláz



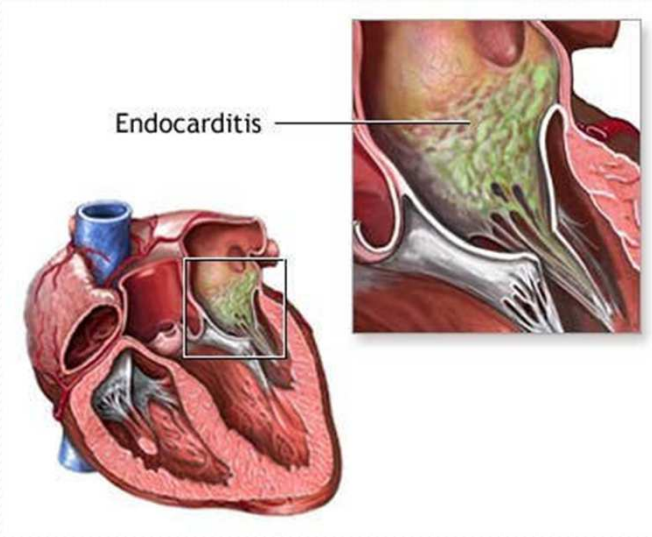
Staph. aureus

- Mastitidy
  - Zánět mléčné žlázy
  - Kojící ženy (2-3 týden po porodu)
- Ranné infekce, celulitida, fascitida
  - Po úrazu
    - Tříska, špína, stehy
  - Tvorba abscesů
- Záněty kostí a kloubů
  - Hematogenně, po úrazu
  - Purulentní meningitida, abscesy



Staph. aureus

- Pneumonie
  - Sekundárně
    - Při těžkém poškození epitelu
  - Hematogenně
  - Abscesy, rozpad tkáně, tvorba empyému
- Endokarditida
  - Nejzávažnější stafylokoková infekce
  - Vysoká horečka
  - Metastatické abscesy a embolizace
  - Intravenózní narkomani
- Sepse
  - Zdroj absces, osteomyelitida, endokarditida



Staph. aureus

- Stafylokoková enterotoxikóza
  - Alimentární intoxikace
  - Zdroj hnisavá afekce rukou člověka pracující na přípravě jídla
    - Smetanové omáčky, vaječné krémy
  - Pomnožení stafylokoka v jídle → tvorba enterotoxinu
  - Inkubační doba 3 hod, zvracení, četné stolice, rychlý průběh
  - Léčba symptomatická

Staph. aureus

- Stafylokokový syndrom toxického šoku
  - Dvě formy
    - Menstruální forma
      - V souvislosti s používání tampónů
    - Non-menstruální forma
      - Ranné infekce, rychlá progrese
  - Klinická manifestace
    - Horečka
    - Hypotenze
    - Exantém (skarlatiniformní, petechie)
    - Polyorgánové postižení
      - Injekce spojivek, zvracení, průjem, myalgie, elevace urey, kreatininu, bilirubinu AST, ALT, trombocytopenie, dezorientace, enantém
    - Negativní průkaz jiných původců
    - Olupování kůže – pozdní

Staph. aureus

- Stafylokokový syndrom opařené kůže - exfoliatiny
  - Bulózní impetigo
    - Mírnější forma
  - Generalizovaná forma
    - Olupování ploch pokožky od škáry v bělavých plátech
      - Obnažená jasně červená dermis
    - Typicky u novorozenců
      - Brána vstupu infekce pupečníkový pahýl, kůže
      - Zdroj zaměstnanci
  - Průkaz z kožní lézí je negativní

Staph. aureus - terapie

- Chirurgický zákrok
  - Punkce, incize, drenáž
- ATB
  - Citlivé kmeny
    - Oxacilin
  - MRSA
    - vankomycin, (linezolid, kotrimoxazol)
  - Lokálně
    - Mupirocin

Koaguláza negativní stafylokoky

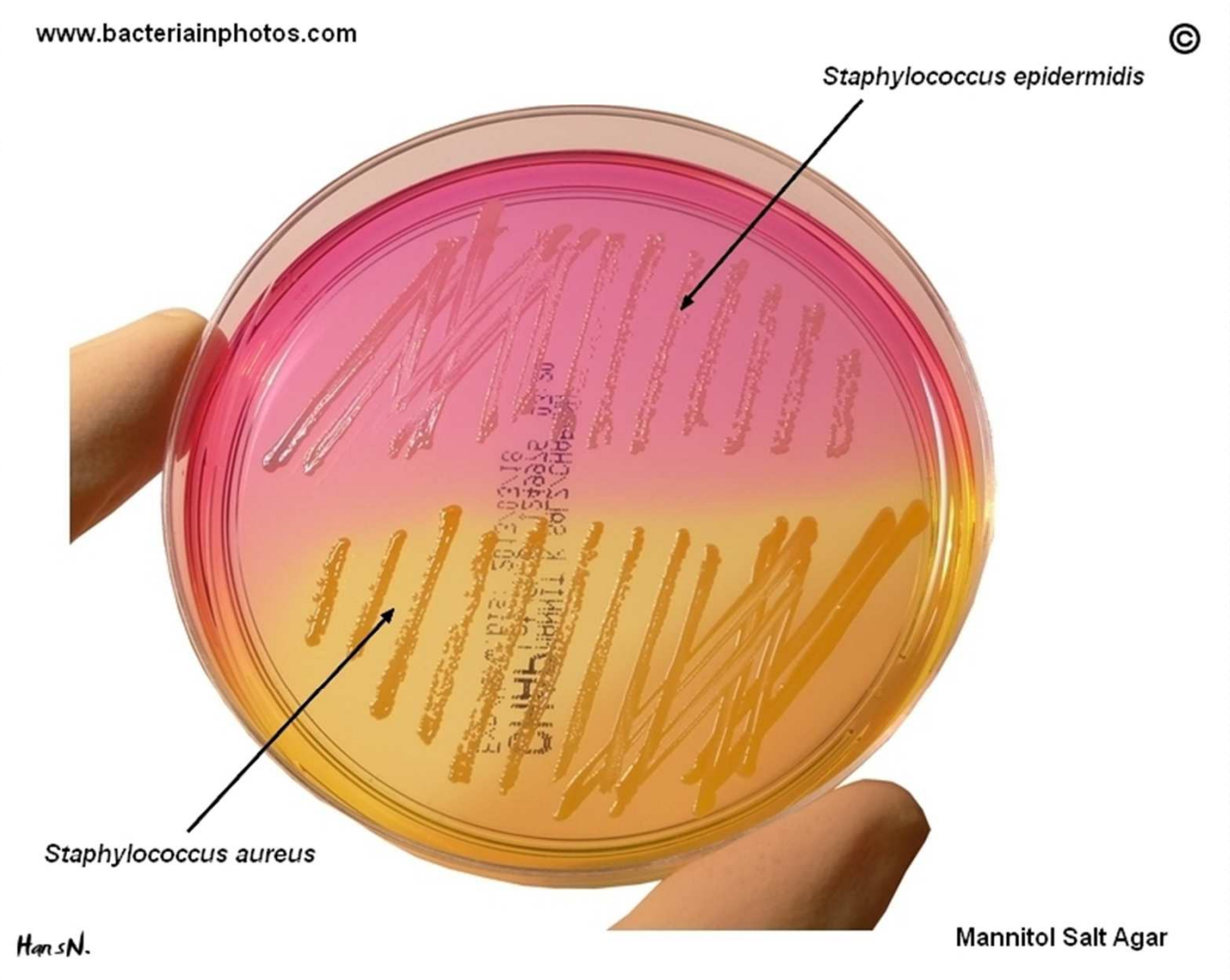
- Běžná flóra kůže a sliznic
- Podmíněně patogenní
- Významný faktorem virulence je tvorba biofilmu
- Zástupci
  - *Staph. epidermidis*
  - *Staph. saprophyticus*
  - *Staph. hominis*
  - *Staph. lugdunensis*
  - *Staph. novobiosepticum*

Koaguláza negativní stafylokoky

- Infekce implantátů a cizích těles
  - Katétrové sepse, protézové endokarditidy, peritonitidy dialyzovaných pacientů, infekce kardiostimulátorů, kloubních náhrad, atd.
  - Sepse mají mírnější průběh
- Infekce močových cest
  - *Staph. saprophyticus*
  - Infekce močových cest u mladých žen (1/5 případů)
- Terapie
  - Většinou hodně rezistentní kmeny
    - ATB podle vyšetření citlivosti
    - Glykopeptidy

Rod *Staphylococcus*

- Odběr materiálu
  - Výtěry z ran, abscesu, hnis, krev, sputum, moč, atd.
- Kultivace
  - Kultivační půdy
    - Běžná kultivační média
      - Na KA malé bílé kolonie
      - *Staph. aureus* - výrazná beta-hemolýza na KA (alfa-hemolyzin)
    - Selektivní kultivační médium s 10% NaCl a mannitolem
      - *Staph. aureus* – žluté kolonie se žlutým okolí půdy
  - Podmínky kultivace
    - 37 °C 18-24 hod aerobně běžná kultivační média
    - 37 °C 48 hod aerobně selektivní kultivační média



Selektivní kultivační médium s obsahem NaCl a mannitolu – nahoře *Staph. epidermidis*, dole *Stap. aureus*

Rod *Staphylococcus*

- Diagnostika
  - Mikroskopie
    - Gramovo barvení – G+ koky ve shlucích, nerozlišíme druh
  - Biochemická aktivita
    - Všechny druhy - kataláza pozitivní
    - *Staph. aureus* - volná i vázaná koaguláza pozitivní
    - Průkaz toxinů
    - Biochemické sety
    - Aglutinační test
  - Hmotnostní spektrometrie
  - PCR

Rod *Staphylococcus*

- Vázaná koaguláza (clumping faktor)
  - Povrchový protein schopný vázat fibrinogen
  - V diagnostice se využívá králičí plasma
    - Pozitivní reakce - pozorujeme aglutinaci
- Volná koaguláza
  - Extracelulární protein schopný vázat koaguláza reaktivní faktor – stafytrombin
  - Katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin
  - V diagnostice se provádí zkumavkový test
    - Do zkumavky s králičí plasmou se přidává narostlá kultura a nechá se inkubovat 3 hod při 37 °C a poté 24 hod při pokojové teplotě
    - Pozitivní reakce – shluky/sraženina

PASTOREX™ STAPH-PLUS

Rychlý aglutinační test pro souběžnou detekci afinity k fibrinogenu (clumping faktor), proteinu A a kapsulárních polysacharidů *Staphylococcus aureus*.

- **Princip**
  - Reagencie obsahuje latexové částice senzibilizované fibrinogenem a IgG a specifickou monoklonální protilátkou proti kapsulárním polysacharidům *Staphylococcus aureus.*
- **Využití**
  - Identifikace *Staphylococcus aureus.*
- **Pracovní postup**
  - Řádně protřepte lahvičku s latexovými částicemi.
  - Kápněte 1 kapku z této lahvičky na testovací kartičku do testovacího pole.
  - Vypálenou kličkou resuspendujte do kapky dvě kolonie testovaného stafylokoka.
  - Po dobu 20 sekund kýveme testovací kartičkou a sledujeme výskyt aglutinační reakce.
- **Vyhodnocení**
  - Pozitivní aglutinační reakce – jedná se o kmen *S. aureus.*
  - Negativní aglutinační reakce - jedná se o některého z koaguláza-negativních stafylokoků.