

Laboratorní diagnostika hemofilů

ROD HAEMOPHILUS

Jedná se drobné gramnegativní tyčinky s vysokými kultivačními nároky. U člověka působí komplikace hlavně virových infekcí dýchacích cest, středního ucha a vedlejších dutin. Jsou významným původcem meningitid.

Mikroskopie: drobné štíhlé, gramnegativní tyčinky, opouzdržené i neopouzdržené.

Kultivace: Hemofily jsou kultivačně velmi náročné. Vyžadují růstové faktory V (nikotina-
midadenindinukleotid) a X (hemin), které jsou obsaženy v erytrocytech, ale hemofily je ne-
dokáží sami uvolnit. Kultivují se na čokoládovém nebo Levinthalově agaru, kde jsou růstové
faktory z erytrocytů uvolněny teplem. Aby půdy byly selektivní, přidává se bacitracin.

Čokoládový agar – šedé, průhledné kolonie

Levinthalův agar – průhledné lesklé kolonie.

V obou případech se půdy nechávají kultivovat 48 hodin za zvýšené tenze CO₂.

Krevní agar – hemofily je možné kultivovat pouze s kmenem *Staphylococcus aureus*,
který svými hemolyziny uvolní z erytrocytů růstové faktory. Hemofily rostou v zóně hemolý-
zy nebo v její těsné blízkosti, tomuto jevu se říká satelitový fenomén.

Identifikace: podle růstu na kultivačních půdách. Různé druhy hemofilů lze odlišit podle
nároků na růstové faktory. Používáme půdy, které neobsahují ani stopy růstových faktorů,
např. živný agar. Půdy se naočkují vyšetřovaným kmenem a na povrch se umístí tři párové
disky. Jeden je nasycen X-faktorem, druhý V-faktorem, třetí směsí faktorů X+V. Pro kontrolu
se kmen naočkuje i na krevní agar k ověření, zda skutečně vykáže satelitový fenomén. Po
inkubaci se druhý den zjišťuje, kolem kterého z disků kmen vyrostl:

X+V *H. influenzae*

H. haemolyticus

X+V : V *H. parainfluenzae*

X+V / X *H. ducreyi*

H. aphrophilus (dovede syntetizovat hemin, takže nemá striktní

požadavky na růstové faktory)

Haemophilus influenzae vyvolává různě závažné respirační infekce (sinusitidy, otitidy), u
dětí hnisavou konjunktivitidu. Z opouzdržených kmenů *H. influenzae* se nejčastěji izolují seroty-
py b a f. U dětí do 5 let jsou nejčastějším původcem hnisavé meningitidy a epiglottitidy.

Haemophilus parainfluenzae se považuje za normální mikroflóru horních cest dýchacích. Mů-
že však vyvolat sinusitidu, bakteriémií, endokarditidu.

Haemophilus aphrophilus je normálním obyvatelem horních částí respiračního traktu.

Haemophilus ducreyi je původcem klasické pohlavně přenosné choroby, měkkého vředu (*ulcus molle*). Choroba se projevuje bolestivými vředy na sliznicích urogenitálu.

Nepřímý průkaz: metodou ELISA stanovení hladiny protilátek proti *H. influenzae* typ b pro
vřednaté, proutlakové onemocnění po očkování.

IDENTIFIKACE: POK PEAR, LEVINTHAL AGAR, VYTRATIT FAKTOR V, (KA), FAKTOR X
KONTROLA: KA 22 h, 1 h, FAKTOR: X, V, X+V, VYTRATIT
POVRCH: KONTROLA HEH, DOVEDE HEH, VYTRATIT X+V

Příklad použití: Identifikace *N. meningitidis* z výtěru krku

Vysvětlivky :

V+K - vankomycin-kolistinový disk - v místě difuze antibiotik rostou pouze *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica* a kvasinky.

Jejich odlišení:

- kvasinky - mikroskopický preparát
- *N. lactamica* - pomoci **ONPtestu** - do 1 h ONPG + (žlutá barva)
- ONPG negat. - identifikovat pomoci **NEISSERIAtestu**
- *N. meningitidis* - (ONPG negat.) - **NEISSERIAtest** - výsledek do 4 h
- možnost serotypizace tentýž den

B₁₀ - bacitracinový disk 10j. - v místě difuze ATB rostou hemofily, jejich další odlišení pomoci disků **X, V** a **XV-Faktor**

- stafylokoková čára umožňující satelitní růst hemofilům

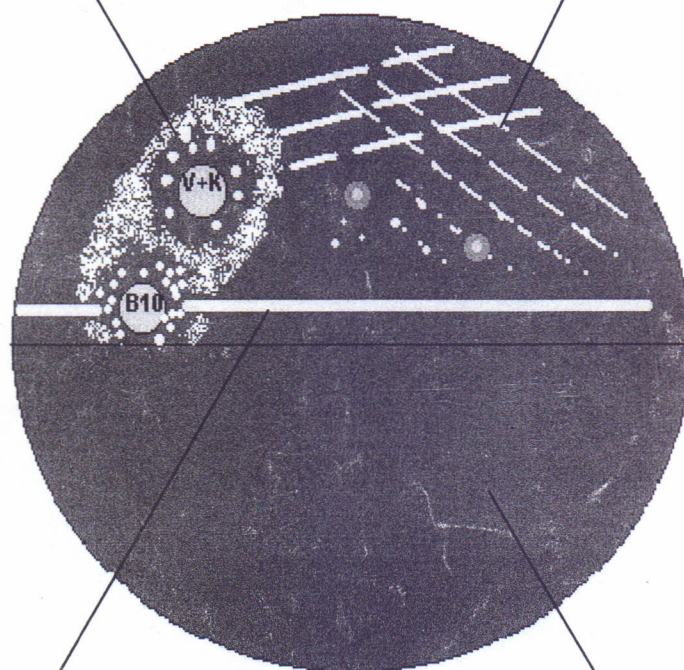
Poznámka: do místa rozočkování izolovaných kolónií je možno vložit disk **OPTOCHIN** pro detekci pneumokoků, v takovém případě je nutné pro rozočkování použít celou misku krevního agaru

masivní nátěr

rozočkování do izolovaných kolónií - izolace hemolytických streptokoků, pneumokoků

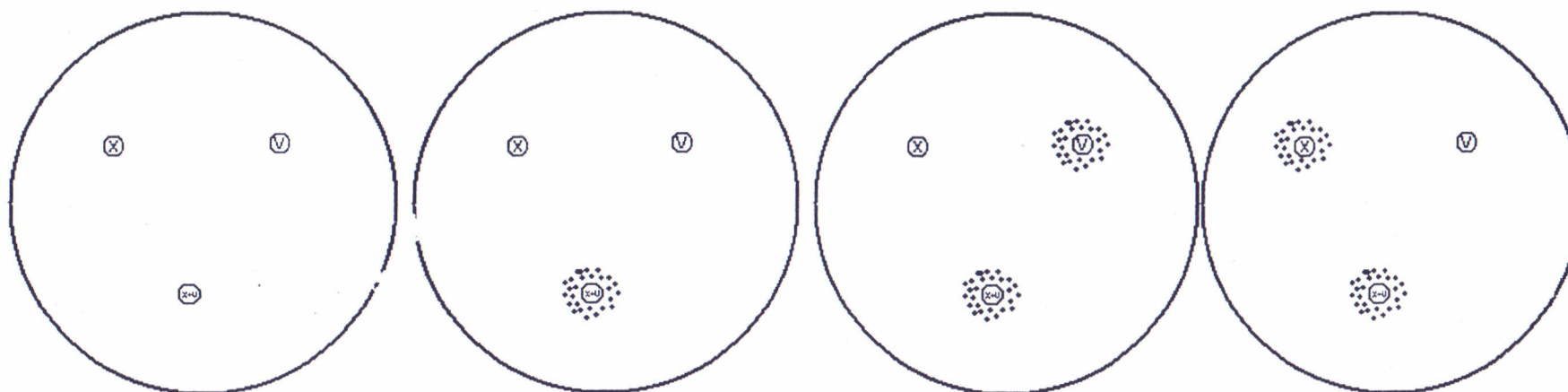
stafylokoková čára

krevní agar



Určování hemofilů, schema

Druhová identifikace hemofila (test potřeby nutričních faktorů)



1) Umístění disků na agarové plotně

2) Výsledek - potřeba obou faktorů (*H. influenzae*)

3) Výsledek - potřeba pouze V-faktoru (*H. parainfluenzae*)

4) Výsledek - potřeba pouze X-faktoru (*H. aphrophilus*)

číslo: Příloha č.9	název: Určování hemofilů, schema			
účinnost: 21.1.2016	výtisk: 7		vydání: 7	strana: 1/1
zpracoval: MUDr. Lenka Černohorská, Ph.D.		Přezkoumal a schválil: doc. MUDr. Filip Růžicka, Ph.D.		