Jméno: Kruh: Datum:

Diagnostika hemofilů a G– nefermentujících tyčinek

Tabulka pro hlavní výsledky úkolů 1 až 5:

Kmen		K	L	M	N	P	Q	R	S
Gramovo barvení – Úkol 1									
Kultivace Úkol 2	Růst na KA (A/N)								
	Růstové charakteristiky na KA (ČA*)								
	Endova p. (–/L-/L+)								
	MH agar (barva)								
Úkol 3a Satelitový fenomén (+/–)									
Úkol 3b Růstové f. (X, V, X + V)									
Fermentace gluk. Úkol 4 (Hajna)									
Oxidázový test Úkol 5a									
NefermTest 24 (Úkol 5b)									
KONEČNÝ ZÁVĚR									

*Pro bakterie nerostoucí na krevním agaru (KA) použijte čokoládový agar (ČA)

Úkol č. 1: Mikroskopie kmenů

Na stole máte kmeny popsané písmeny. Obarvěte je podle Grama, a do tabulky vepište výsledky. Kmen, který NENÍ G– tyčinka, nebude studován v úkolech 3 až 5 (ale v úkolu 2 si ho pro srovnání popište)

Úkol č. 2: Kultivace na agarových půdách

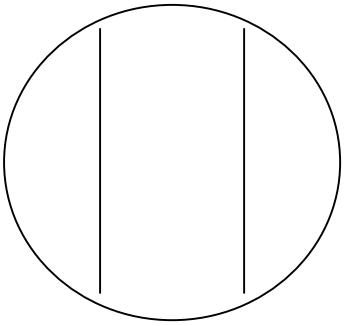
Nejdříve napište, které bakterie rostou na krevním agaru a které ne. Pak, používajíce standardních procedur, popište kolonie všech kmenů na krevním agaru. Pouze ty, které na KA nerostou, popište na čokoládovém agaru. Poté popište růst na Endově půdě (stačí „–“ pokud nerostou, „L+“ pro laktóza pozitivní a „L–“ pro laktóza negativní) a na MH agaru (jen „–“ nebo „+“, a případně přítomnost specifického zbarvení).

Jméno: Kruh: Datum:

Úkol č. 3: Identifikace hemofilů a jejich přesnější určení

a) Satelitový fenomén

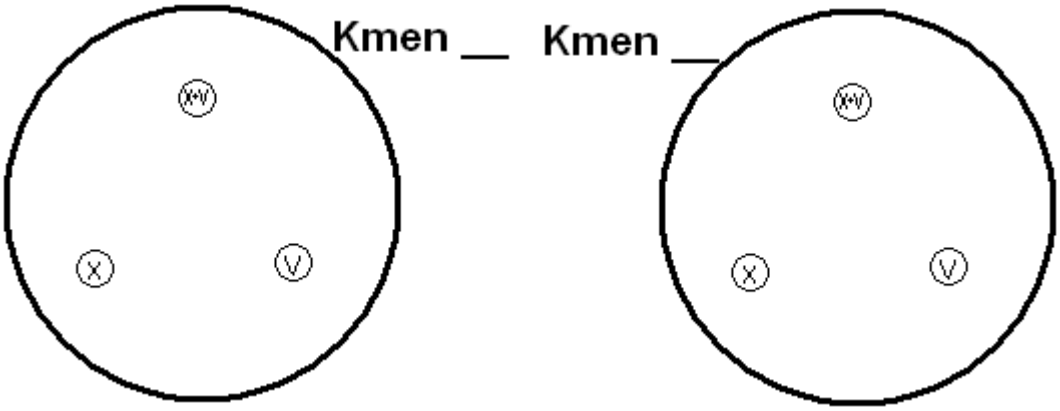
Hemofily jsou typické takzvaným satelitovým fenoménem. To znamená, že samy o sobě nerostou na krevním agaru, ale jsou tam schopny růst v přítomnosti kmene, který pro ně z krvinek uvolní růstové faktory. Pro tento účel se zpravidla používá kmen *Staphylococcus aureus*. Zakreslete satelitový fenomén a spojte popisky s příslušnými jevy na obrázku



Staphylococcus aureus Kolonie hemofilů

b) Identifikace hemofilů podle potřeby růstových faktorů

Určete dané kmeny podle potřeby růstových faktorů. Zakreslete výsledek faktorového testu pro oba kmeny.



Úkol č. 4: Hajnova půda

Prohlédněte si kultivační výsledky čtyř kmenů na Hajnově půdě. Kmen, který fermentuje glukózu (žlutá barva) označte jako „+“, kmeny nefermentující (červená) jako „–“.

Úkol č. 5: Určení G– glukózu nefermentujících bakterií

a) Oxidázový test

Demonstrace oxidázového testu u tří kmenů určených jako G– nefermentující bakterie. Zapište výsledky do tabulky. (*Pseudomonas* je vždy pozitivní, *Burkholderia* většinou, ale ne nutně pozitivní; na druhou stranu, *Stenotrophomonas* bývá zpravidla negativní).

Oxidáza pozitivní bakterie s typickou vůní a pigmentem (zpravidla zeleným, řidčeji modrým či zrzavým) je prakticky s jistotou *Pseudomonas aeruginosa*. U této bakterie tedy není nutno provádět další biochemické testování, popsané v úkolu 5a. U ostatních dvou kmenů je toto biochemické testování nezbytné.

b) Podrobné biochemické testování

Vyhodnoťte předložené výsledky NEFERMtestu 24, který byl připraven DVA dny předem (rozdíl oproti jiným biochemickým testům) při 30 °C (další rozdíl; jiné testy vyžadují 37 °C). Také způsob odečítání testu je jiný, protože zde máme tři řady. Testy v horní řadě mají vždy hodnotu „1“, v prostřední „2“ a v dolní „4“. První číslice je z oxidázového testu: „0“ pro negativní, „1“ pro pozitivní oxidázu. Z reakcí v důlcích B a A se číslice

Jméno: Kruh: Datum:

nevypočítávají. Máme tedy sedmimístný kód – první pozice je „0“ (oxidáza –) nebo „1“ (oxidáza +) a dalších šest může nabývat hodnot 0 až 7 dle výsledku testů ve sloupcích H až C.

Kmen:		OX	H	G	F	E	D	C	B	A	Kód:	
	1										Identifikace:	
	2										% pravděpodobn.:	
	4										Index typičnosti:	
	Kód											
Kmen:		OX	H	G	F	E	D	C	B	A	Kód:	
	1										Identifikace:	
	2										% pravděpodobn.:	
	4										Index typičnosti:	
	Kód											

Poznámky:

Úkol č. 6: Testy citlivosti patogenů na antibiotika

Mezi vašimi bakteriemi je pět patogenních: dvě z čeledi *Pasteurellaceae* a tři G– nefermentující. Zapište celé názvy antibiotik a změřte velikost zón. Zapište kmeny jako citlivé (C) resistentní (R) a dubiózní (D). (Dubiózní jsou ty, které mají velikost zóny právě hraniční.)

Test pro hemofily

Kmen →			Kmen →		
Antibiotikum (celé jméno)	∅ zóny (mm)	Interpr.	Antibiotikum (celé jméno)	∅ zóny (mm)	Interpr.

Test pro G– nefermentující

Kmen →						
Antibiotikum (celé jméno)	∅ zóny (mm)	Interpr.	∅ zóny (mm)	Interpr.	∅ zóny (mm)	Interpr.

Jméno: Kruh: Datum:

Úkol č. 7: Vztahy bakterií ke kyslíku – porovnání enterobakterií, G– nefermentujících a anaerobů

Podívejte se na bujóny kultivované za aerobních a anaerobních podmínek (vrstva parafinu na povrchu), vyhodnoťte růst bakterií a jeho charakter.

Kmen			
Růst v bujónu			
Růst ve VL bujónu			
Závěr			

Kontrolní otázky:

1. Za jakých okolností jsou hemofily schopny růst na krevním agaru? Proč?

2. Ve kterém materiálu nejspíše nalezneme *Pasteurella multocida*?

3. Který hemofil je nejvíce patogenní? Které závažné infekce způsobuje?

4. Proč v posledních letech u nás klesá počet batolecích meningitid působených hemofily?

5. Proč zpravidla u *Pseudomonas aeruginosa* není nutno provádět biochemické testování?

6. Jaké infekce nejčastěji způsobují gramnegativní nefermentující tyčinky?

7. Navrhněte antibiotika vhodná pro léčbu infekcí způsobených nefermentujícími tyčinkami.