

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl pátý:

Gramnegativní zločinci II

Přehled lékařsky významných G - tyčinek

Hemofil



Příběh	Endo	Skupina
P04	roste	Enterobacteriaceae (GLC +, OXI -)
P04	roste	Vibrionaceae (GLC +, OXI +)
P04	ne	<i>Campylobacter</i> a <i>Helicobacter</i>
3. + 4.	roste	G- nefermentující bakterie (GLC -)
1. + 2.	ne	<i>Pasteurellaceae</i>
P06	ne	Další G- tyčinky, viz příští praktikum

Na začátek
motto...

Bylo nevlídno, že by PSAE ven
nevyhnal...

(PSAE – zkratka pro *Pseudomonas aeruginosa*)

textbookofbacteriology.net



Přehled témat

Klinická charakteristika – *Pasteurellaceae*

Klinická charakteristika – Gram– nefermentující bakterie

Diagnostika hemofilů a pasteurel

Diagnostika gramnegativních nefermentujících bakterií

Klinická
charakteristika –
Pasteurellaceae

Příběh první

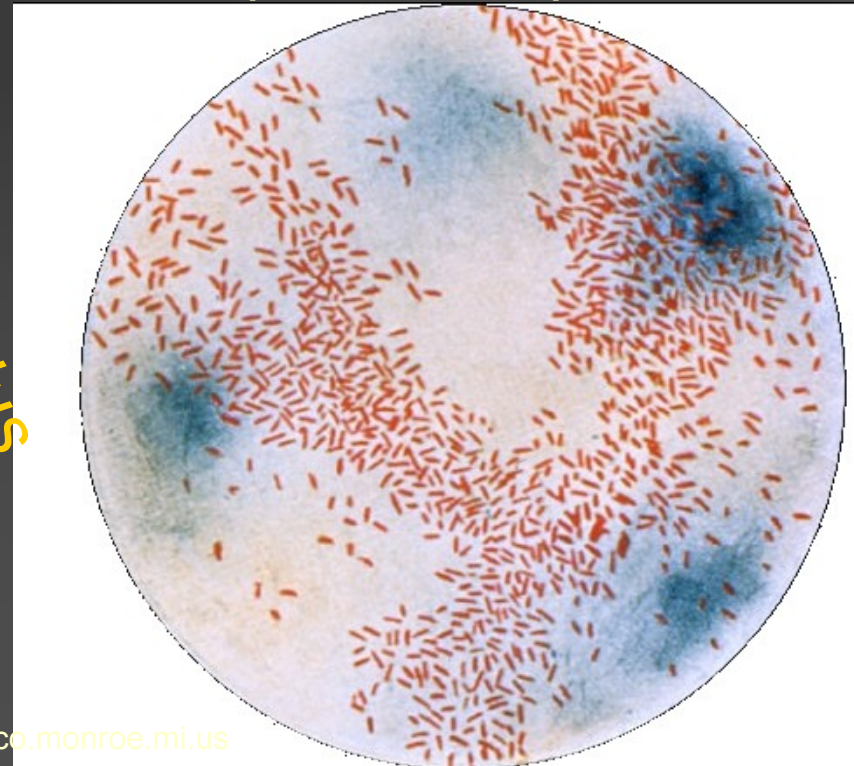


- **Čtyřletý Kubík** je hodný kluk, ale jeho rodiče jsou členy jakési sekty a **nechtějí Kubíka nechat očkovat**. Nejraději by ho měli pořád doma, ale nakonec ho kvůli práci přece dali do školky...
- Po měsíci ve školce **začal být Kubík nachlazený**, a nakonec se začal dusit a sípavě dýchat. Volali RZP, záchranáři už uvažovali o koniopunkci, nakonec ale nebyla nutná. Ukázalo se, že **Kubík má zánět příklopky hrtanové** – nemoc, která se dnes už moc často nevidí...

Kdo to Kubíkovi udělal?

- Viník: *Haemophilus influenzae* ser. b (Hib)
- Hemofily jsou **krátké gramnegativní tyčinky**. Hemofily patří do čeledi *Pasteurellaceae* společně s rodem *Pasteurella* (viz dále)


Haemophilus



Klasifikace hemofilů

- ***Haemophilus influenzae***
 - **pouzderný typ b (Hib)** – proti tomu se očkuje
 - pouzderné typy a, c, d, e, f
 - neopouzdržené kmeny
- ***Haemophilus parainfluenzae*** (mnohem běžnější a mnohem méně patogenní)
- ***Haemophilus aphrophilus*** a mnoho dalších druhů
- ***Haemophilus ducreyi***, původce pohlavně přenášené choroby **ulcus molle**

Patogenita hemofilů

- Nejzávažnější hemofilové choroby jsou **epiglottitis, meningitis a sepse**. Způsobuje je hlavně *Haemophilus influenzae*, serotyp b.
- Další časté choroby jsou **otitis media**  **a sinusitis** (zde po *Streptococcus pneumoniae* a společně s *Moraxella catarrhalis*)
- Velmi běžná je **přítomnost hemofilů v krku**, přičemž patogenní role je velmi pochybná. Zvláště v případě *Haemophilus parainfluenzae* nepředpokládáme, že by byl patogenem.

Hemofilové onemocnění

<http://www.immune.org.nz>





H

I

B

MC-77AC

Ulcus molle

- Je to pohlavní choroba, vyskytující se především v subtropických a tropických oblastech



www.fmt.am.gov.br



www.fmt.am.gov.br



<http://www.sexsgdom.dk>

Ulcus molle – měkký vřed (šankroid) – způsoben *Haemophilus ducreyi*

Ulcus durum – tvrdý vřed (šankr) – jeden z příznaků syfilis, způsobené *Treponema pallidum*

Příběh druhý

- Jana se zase jednou toulala v zahradách. Bohužel, jeden plot byl příliš rezivý a pes za ním příliš silný. Pes unikl ven a narazil právě na Janu. **A tak skončila Jana s pokousanou nohou.**
- Majitelé prokázali, že pes je očkovaný proti vzteklině. Avšak **v ráně se brzy objevil hnis.** Ten pak byl poslán do laboratoře. A zločincem byla...

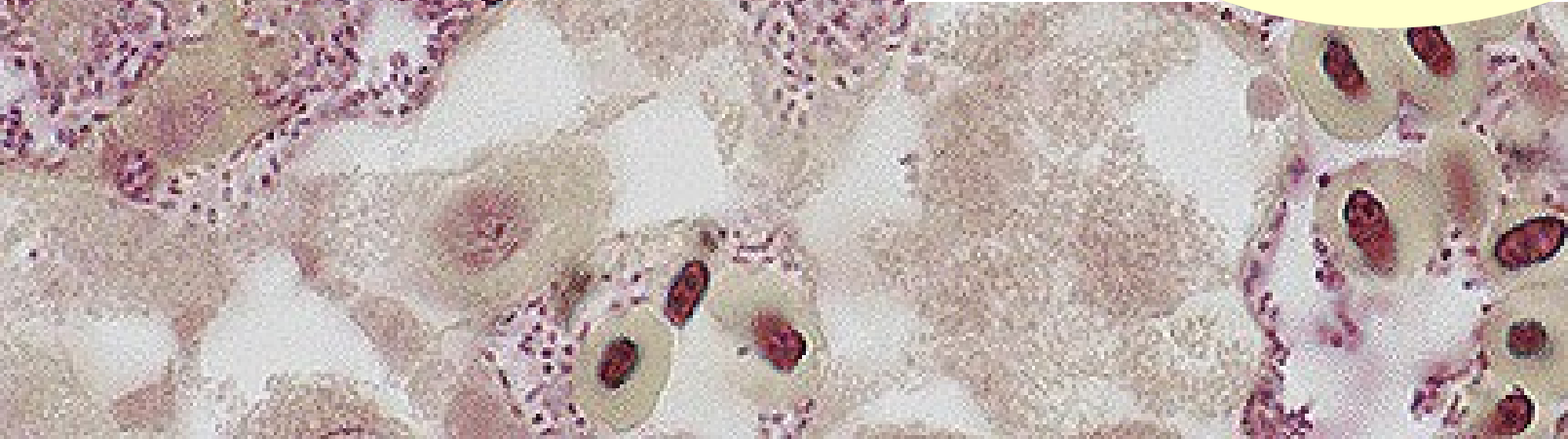
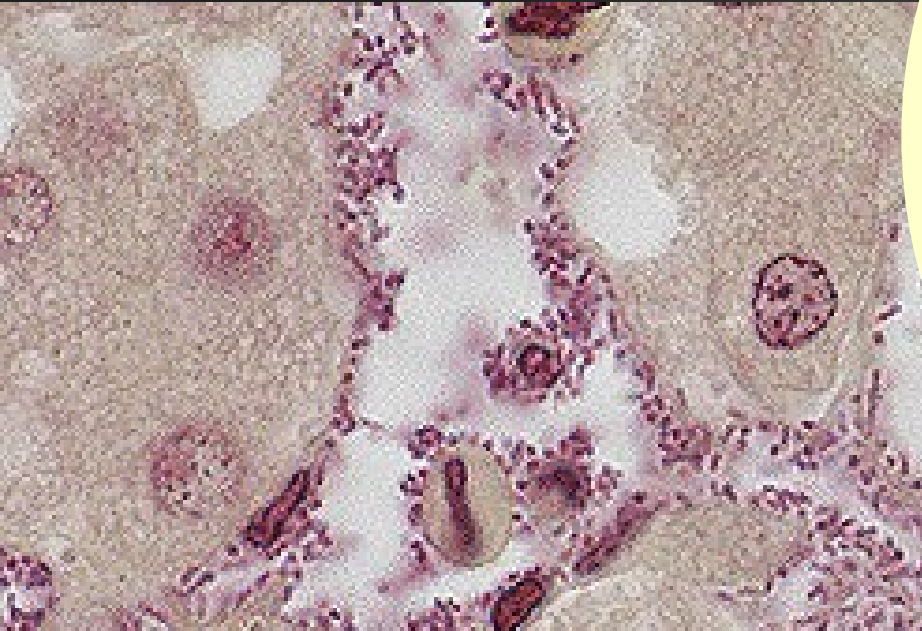
Pasteurella multocida

- *Pasteurella multocida*.
- Je běžnou flórou v psích tlamách.
- U člověka způsobuje zejména zhnisání ran po pokousání psem či jiným zvířetem.
- Má podobný charakteristický pach, podobný hemofilovému (někteří ho spíše přirovnávají k pachu starého hadru), ale na rozdíl od něj roste na krevním agaru (nikoli však na Endově půdě)
- Kolonie na krevním agaru vypadají jako něco mezi streptokokem a enterokokem, ale je rezistentní na vankomycin, což obvykle mikrobiologa „trkne“, zejména při současné citlivosti na penicilin

Pasteurella multocida

<http://library.thinkquest.org>

<http://www.biologico.sp.gov.br>



Klinická
charakteristika –
gramnegativní
nefermentující
bakterie

Příběh třetí



- **Pan Zápalka** je pyroman. Nedávno na svou vášeň doplatil a nehezky se popálil. Nyní se mu **popálenina zanítla**. Leží na popáleninovém centru a je na tom velice špatně. Lékaři naštěstí pochopili, že běžná antibiotika jsou mu platná jako mrtvému zimník a **provedli stěr**. Díky tomu se podařilo najít **cílenou terapii** a pana Zápalku vyléčit – do doby, než zase něco zapálí a způsobí si další popáleniny.

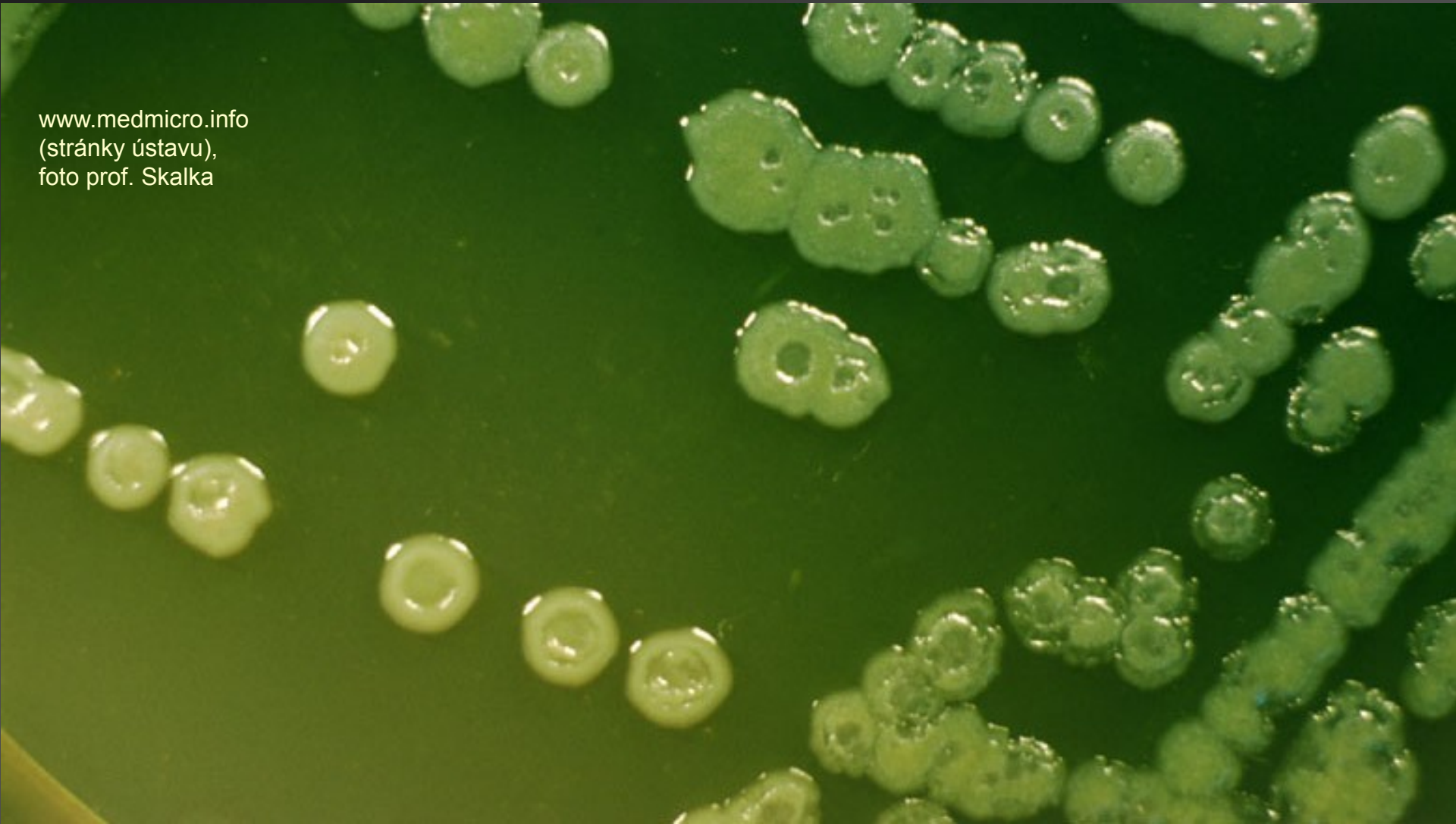
Kdo za to tentokrát může?

- Viníkem je *Pseudomonas aeruginosa*, nejběžnější bakterie ze skupiny gramnegativních nefermentujících baktérií
- Viníkem by stejně dobře mohla být i kterákoli jiná bakterie z této skupiny, např. *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia* nebo *Stenotrophomonas maltophilia*
- Tyto bakterie jsou většinou striktně aerobní, nefermentují, nýbrž degradují cukry aerobní respirací, a jejich adaptace na vnější prostředí se projevuje i jinak – často mají nízké teplotní optimum a často jsou pigmentované, tím vzdorují slunci ve vnějším prostředí

Zeleně pigmentovaný kmen

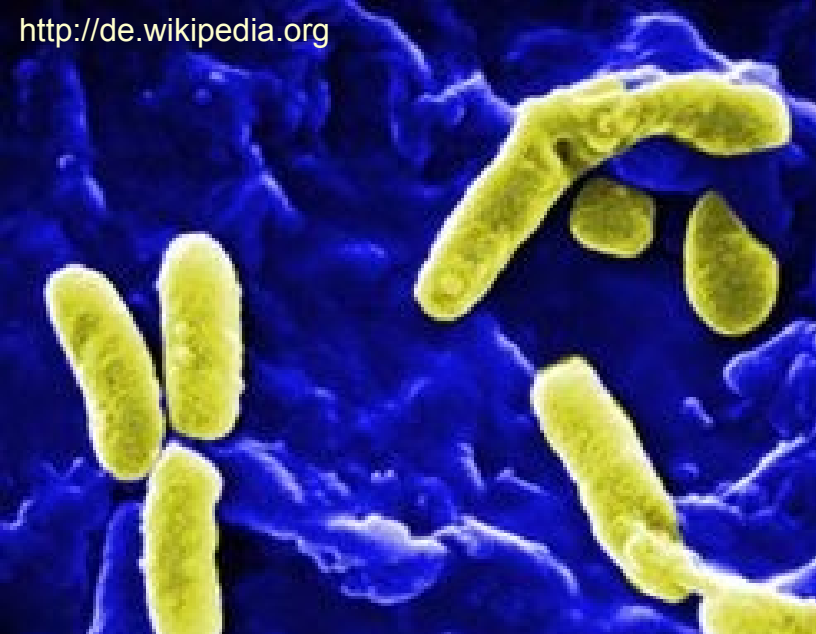
Pseudomonas aeruginosa na MH

www.medmicro.info
(stránky ústavu),
foto prof. Skalka



Pseudomonas aeruginosa





Výjimečný kmen
pseudomonády
s modrým
pigmentem

Patogenita G– nefermentujících

- Obecně: Jsou to bakterie z vnějšího prostředí, často rostlinné patogeny, „bakterie-zbabělci“, které si netroufnou na zdravého člověka. Jejich terčem jsou pacienti s popáleninami, klienti ARK, JIP, transplantačních center a podobně.
- U dlouhodobě hospitalizovaných nezpůsobují jen infekce ran, ale často je nacházíme i např. v dýchacích cestách či dokonce v krevním řečišti.
- Jde tedy o důležité původce nozokomiálních nákaz
- Někdy je ale těžké odlišit pouhou kolonizaci od skutečné infekce – zvláště u povrchových ran často nemá smysl používat celkovou antibiotickou léčbu při nálezů některé z těchto bakterií

U oslabených osob mohou způsobovat např. i zánět nehtového lůžka.



Autokasuistika as. Zahradníčka

Pseudomonády napadají i jinak zdravé lidi při porušení anatomické kožní bariéry. Infekce však bývá jen lokální.

- 13. 1. 2006, pátek, Padang, Západní Sumatra, Indonésie: as. Zahradníček **padá do nezakryté dešťové kanalizace** s následkem poměrně velké **rány** sahající na tibiální okostici
- **O několik týdnů později:** rána je intenzivně cítit pseudomonádou, která je následně z rány i vykultivována. Naštěstí je dobře citlivá
- Terapie: lokálně **gentamicin + polymyxin B** (u infekcí ran je často účinnější lokální léčba než celková, i vzhledem k existenci biofilmu na povrchu rány)
- Terapie úspěšná

Padang

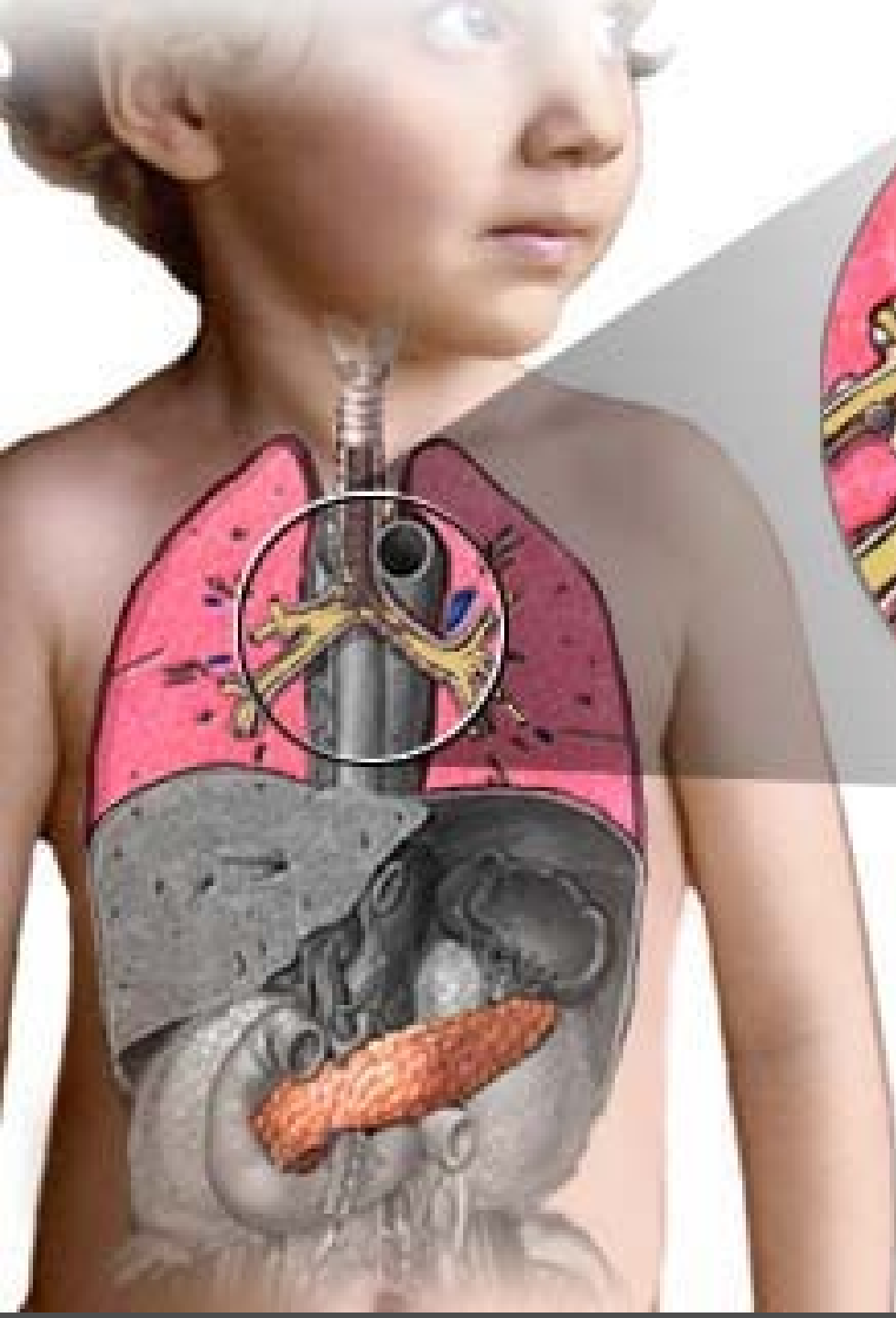


Příběh čtvrtý

- Linda bylo ubohé děvče: trpěla **vrozenou chorobou – cystickou fibrózou**.
- Její **plicní surfaktant se lišil od surfaktantu zdravých lidí**. A tak byla často nemocná.
- Posledně to byl *Staphylococcus aureus*. Tentokrát to bylo jiné: **původcem byla *Burkholderia cepacia***, jedna z G–nefermentujících tyčinek

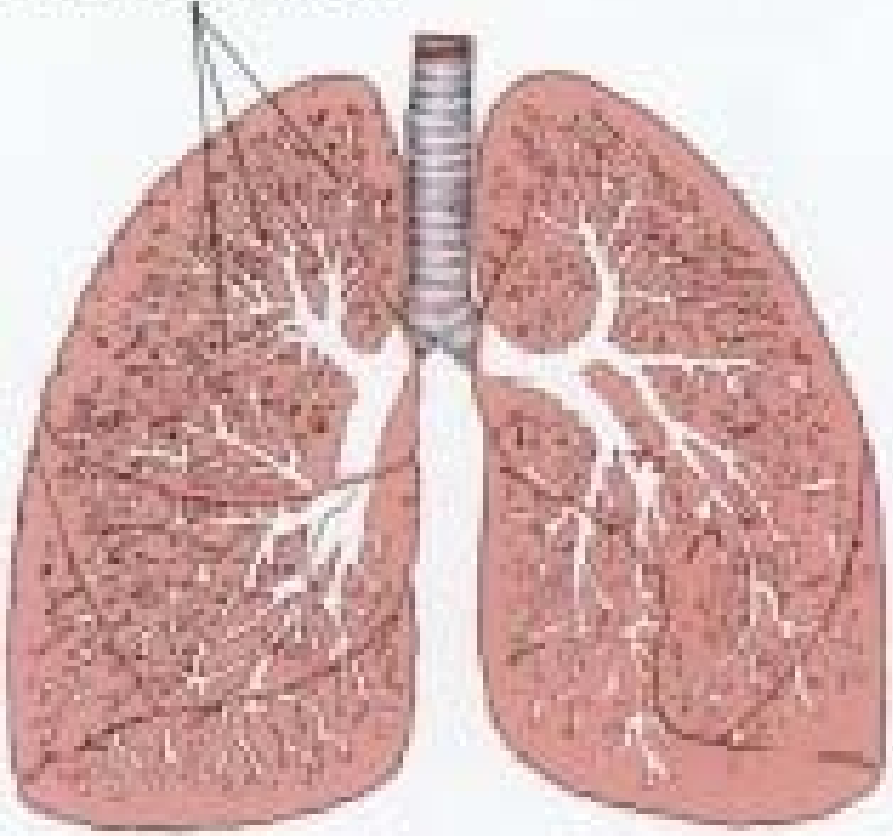
Nefermentující a cystická fibróza

- Cystická fibróza je těžké, **vrozené onemocnění plic** s poruchou produkce normálního plicního surfaktantu. To vede ke změně charakteristikám plic, včetně mnohonásobně zvýšeného rizika infekce
- **Nejčastějšími původci** jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* a *Staphylococcus aureus*. Kmeny zpravidla získají **polyresistenci** a mnohé děti umírají velmi mladé.



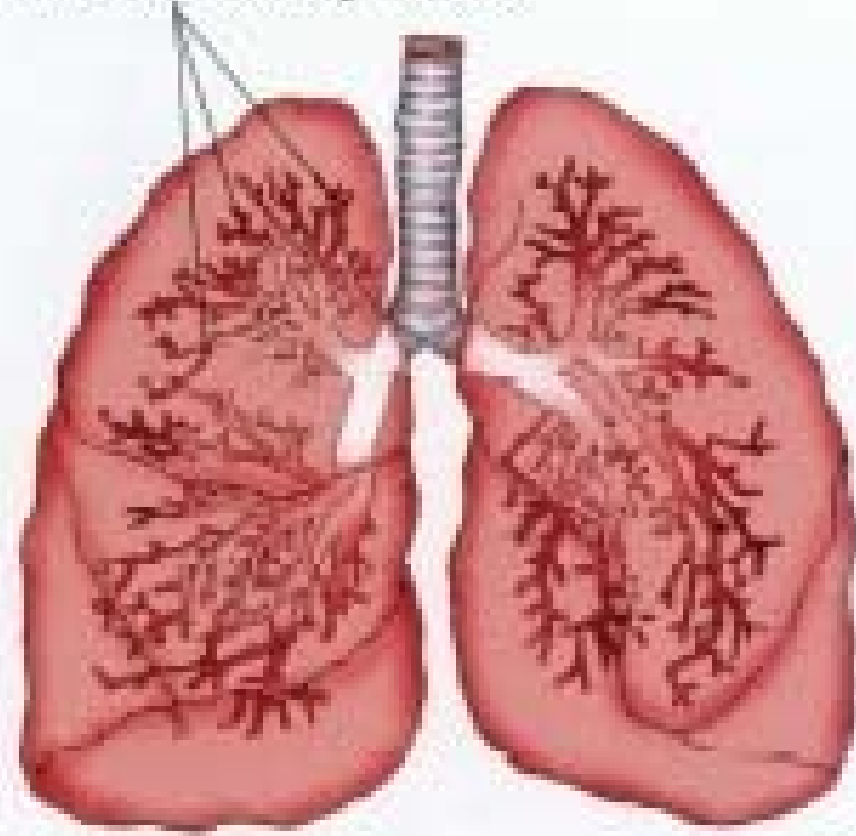
Cystic fibrosis is a hereditary disorder characterized by lung congestion and infection and malabsorption of nutrients by the pancreas

Unobstructed bronchial tubes



Healthy lungs

Bronchial tubes are blocked by mucus



Lungs with cystic fibrosis

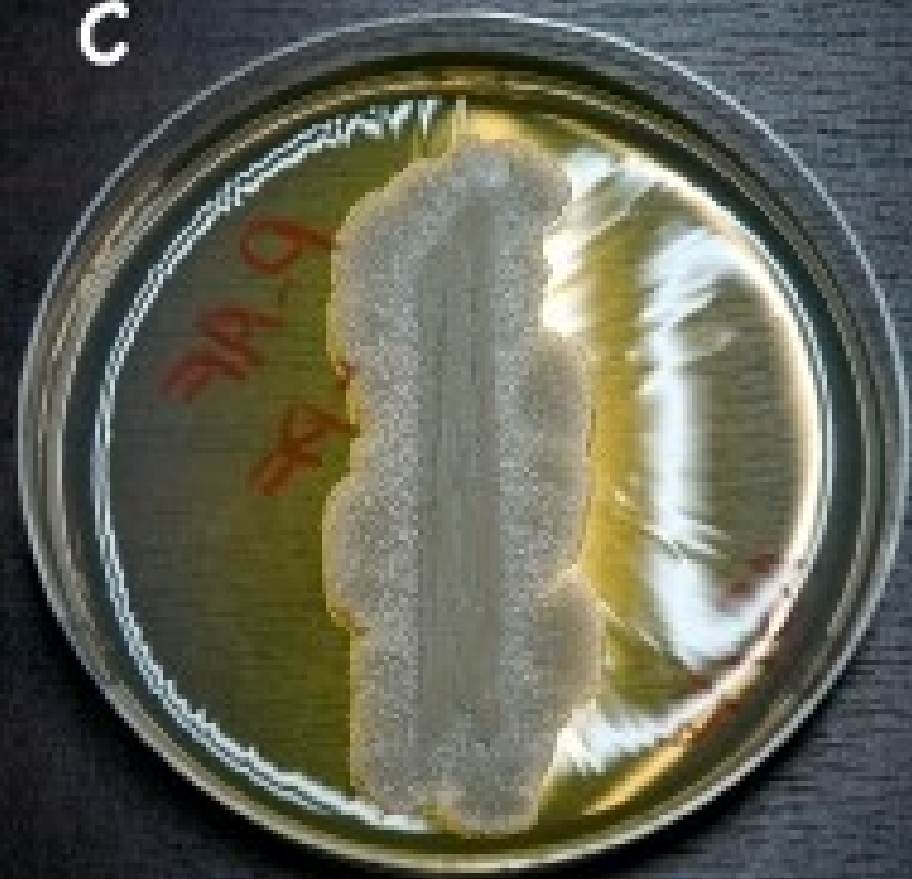


Další „nefermentující“:

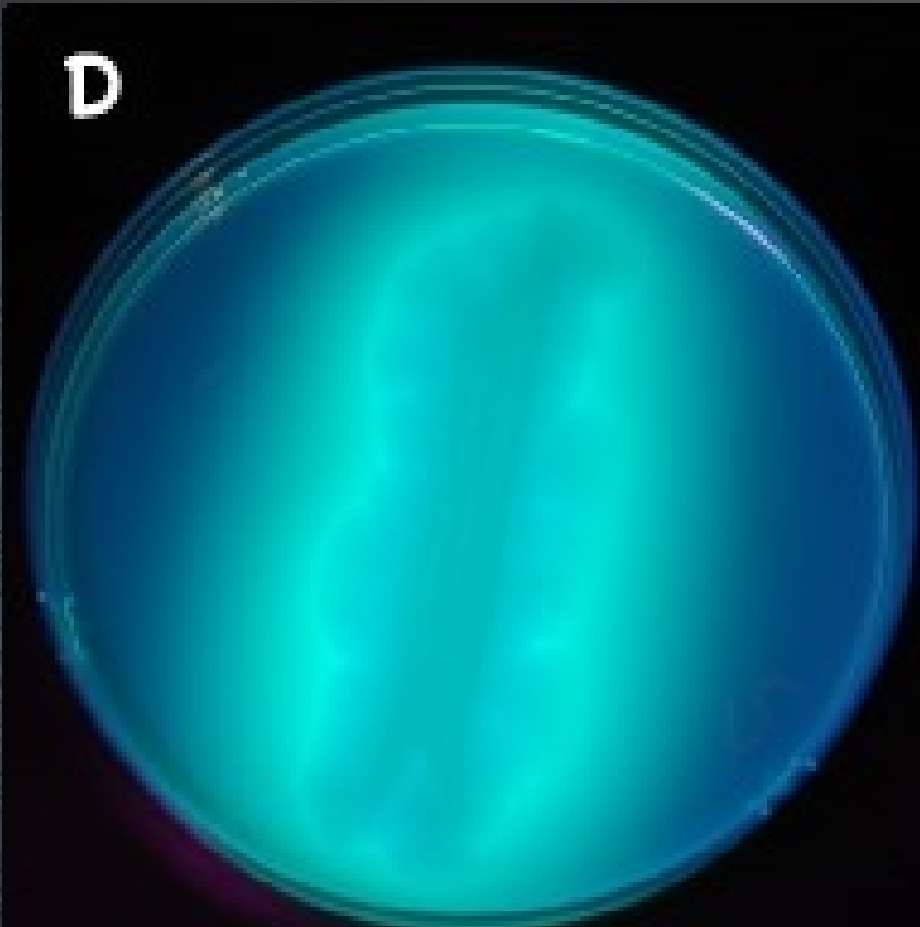
Pseudomonas fluorescens

Podobná *P. aeruginosa*, ale typická fluorescence kolonií pod UV lampou

C



D

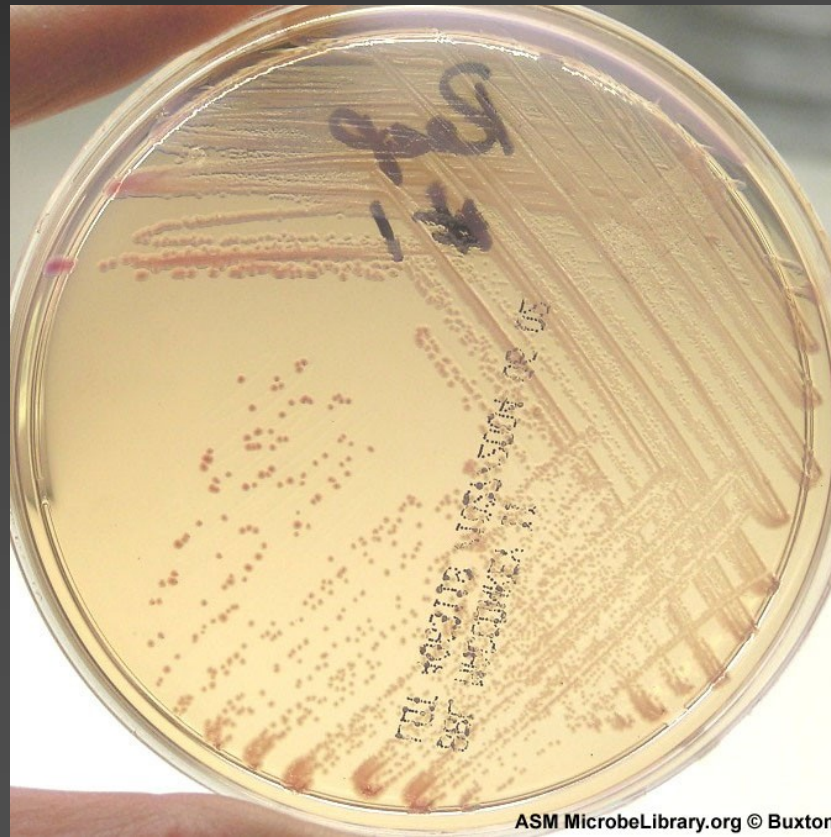




Burkholderia cepacia

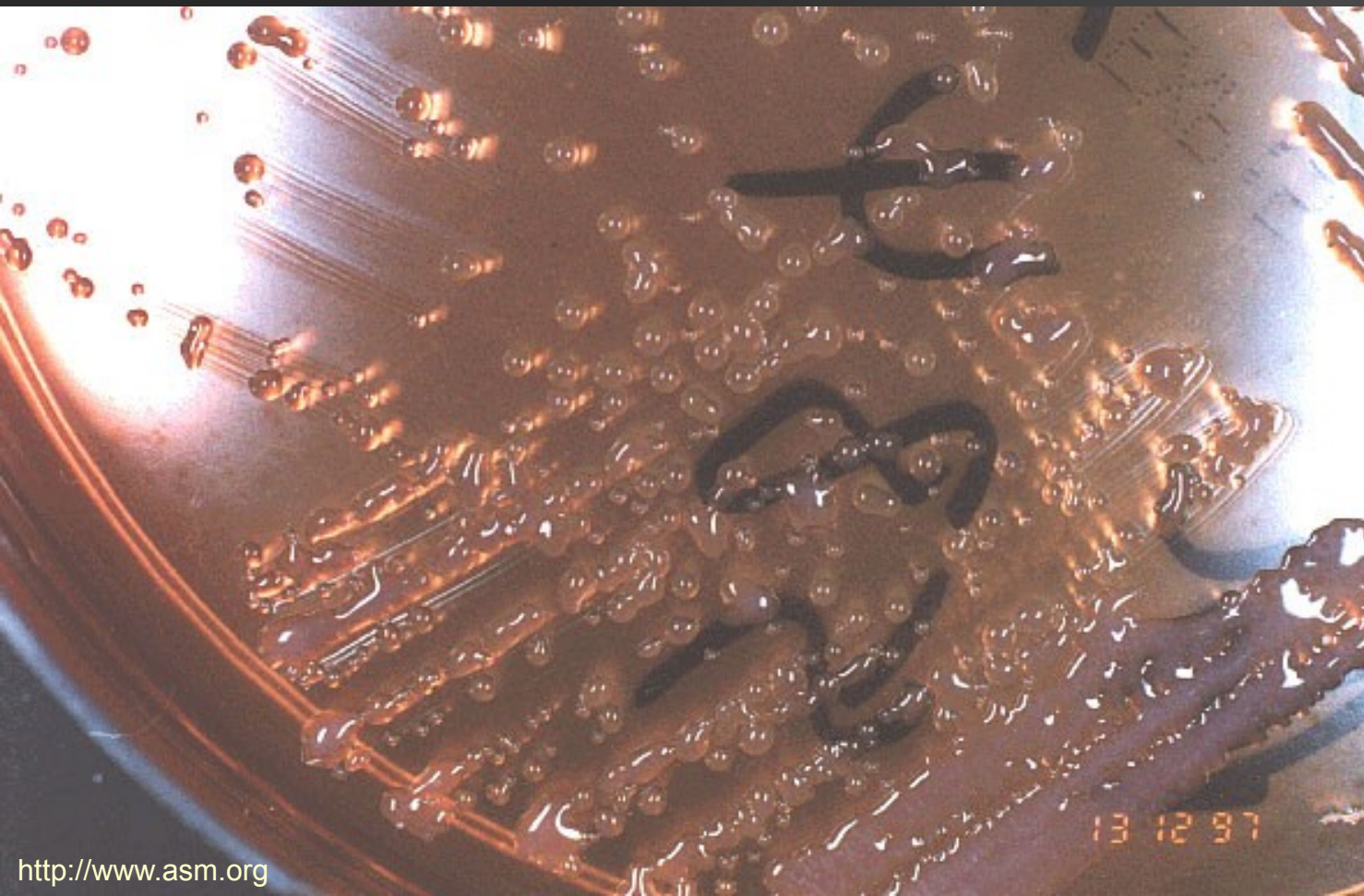
Burkholderia cepacia

způsobuje hnilobu cibule
(*Allium cepa*), je to tedy typický
rostlinný patogen



Burkholderia pseudomallei

Burkholderia pseudomallei je původcem mellioidózy. Příbuzná *B. mallei* způsobuje zoonózu zvanou malleus čili vozňřivka (SK: sopľavka)

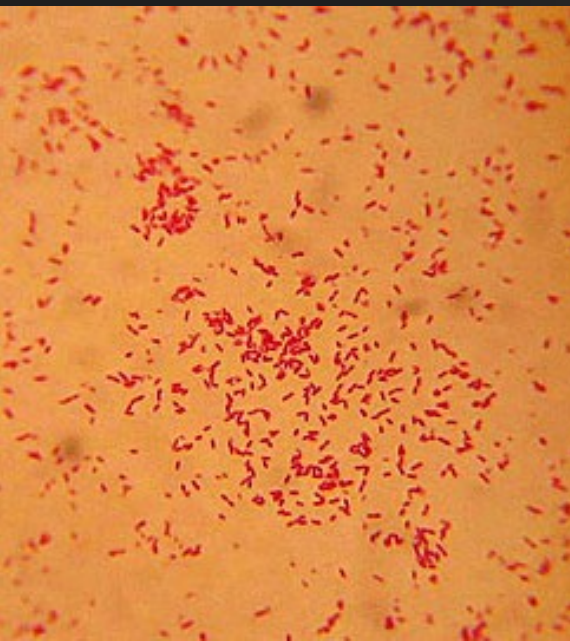


Stenotrophomonas maltophilia

<http://www.scielo.cl>

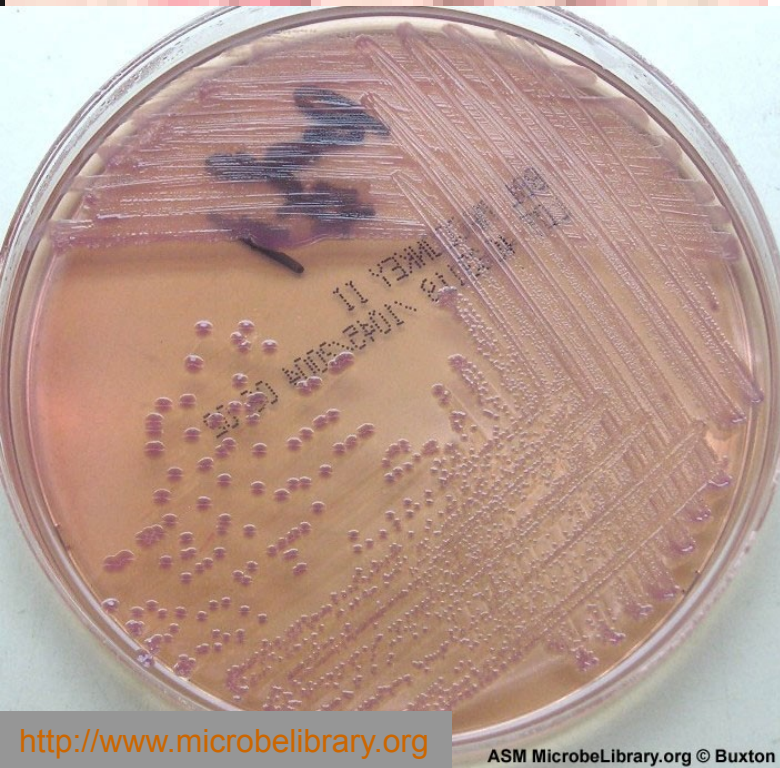
<http://clinicalmicrobiology.stanford.edu>

<http://www.microbelibrary.org>



Stenotrophomonas maltophilia je dlouhé jméno, ale snadno si ho zapamatujete: je to „úzké-výživy-jednotka maltózu-milující, čili „bakteriální panda“, místo bambusu žvýkající maltózu 😊

Acinetobacter



<http://www.buddycom.com>

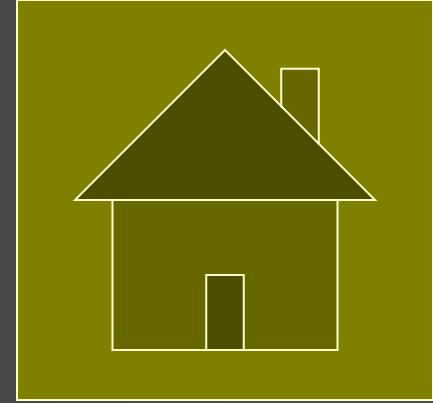
Z řečtiny: a-kineto- = „nepohyblivý“

Metabolismus bakterií a jejich vztah ke kyslíku

Jak již víme, G– nefermentující bakterie provádějí **aerobní respiraci**. Porovnejme nyní dvě bakterie:

- *Escherichia coli* žije ve střevě. Má dost živin, ale málo kyslíku (i když jiných plynů si užije dost 😊) **preferuje fermentaci glukózy i jiných cukrů**. *Escherichia coli* je **fakultativně anaerobní**. Některé další bakterie žijící ve střevě jsou **striktně anaerobní**.
- Naopak **pseudomonády** mají kyslíku habaděj, ale živin málo. Volí tedy **aerobní respiraci**, která jim umožní to málo dostupných živin využít úplně. **Pseudomonády jsou striktně aerobní**

Pseudomonas jako striktní aerob (na rozdíl od jiných)



- Pseudomonáda (I) je striktně aerobní bakterie, nikoli fakultativně anaerobní jako například *Escherichia coli* (kmen III), natož striktně anaerobní jako kmen II (*Bacteroides fragilis*, viz P07).

Kmen	Bujón	VL-bujón	Výsledek
I	roste	neroste	Striktně aerobní bakterie
II	neroste	roste	Striktní anaerob
III	roste	roste	Fakultativní anaerob

Diagnostika hemofilů a pasteurel

Přehled metod použitelných k dopadení bakterií čeledi *Pasteurellaceae*

■ Přímé metody

- **Mikroskopie** – krátké G– tyčinky
- **Kultivace** – *Pasteurellaceae* nerostou na Endově agaru, hemofily dokonce ani na krevním (s výjimkou současné kultivace s jiným mikroblem)
- **Biochemická identifikace** – je možno ji použít
- **Antigenní analýza** – používá se u hemofilů (Hib)
- **Detekce DNA** – rutinně se nepoužívá

Nepřímé metody se téměř nepoužívají

Odlišení čeledi *Pasteurellaceae* (diferenciální diagnostika)

- Gramovo barvení odliší gramnegativní tyčinky od ostatních bakterií
- Endova půda: jak již víme, rostou na ní z klinicky významných jen **enterobakterie**, příslušníci čeledi *Vibrionaceae* a **gramnegativní nefermentující tyčinky**, to tedy znamená, že ***Pasteurellaceae* nerostou**
- *Pasteurellaceae* prozradí zápach a různé další vlastnosti (biochemické, citlivost na antibiotika)

K diagnostice hemofilů a pasteurel



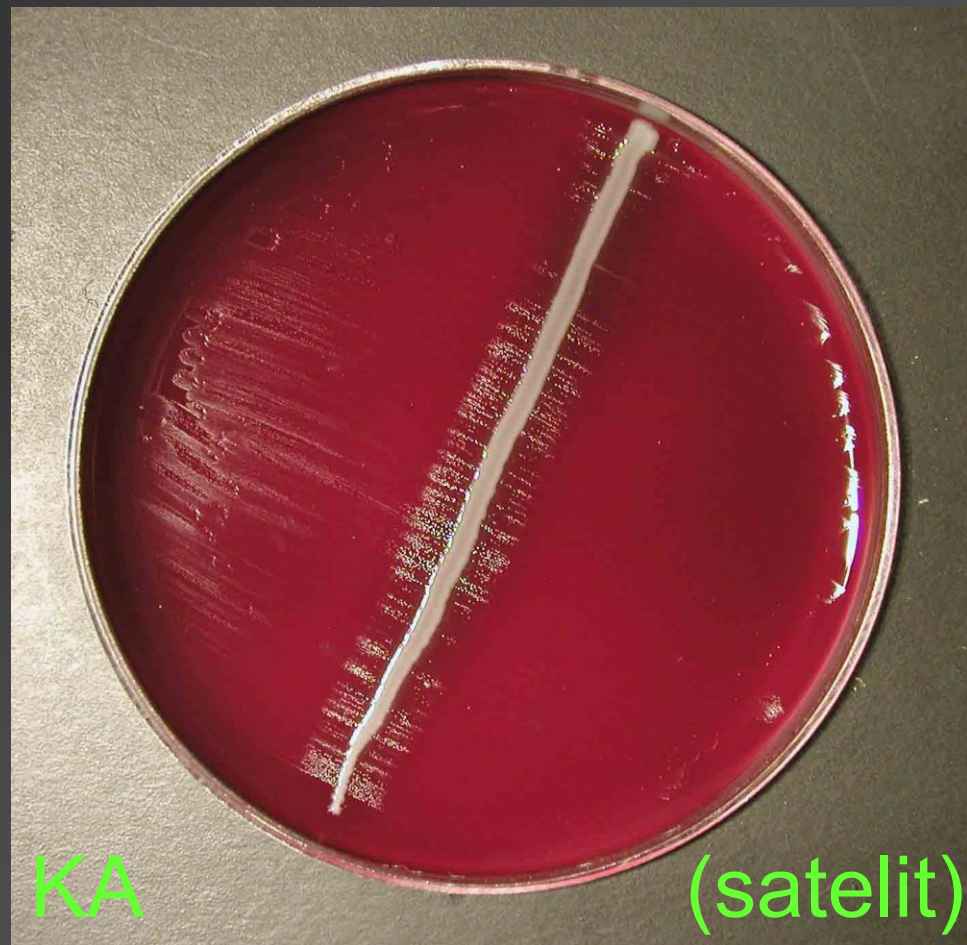
<http://www.uni-ulm.de>

- **Pasteurely** rostou na krevním agaru
- **Hemofily** na krevním agaru růst neumějí, protože si neumějí „otevřít“ krvinku
- Rostou tedy na **čokoládovém agaru**
- Na KA rostou v přítomnosti takové bakterie, která jim krvinku „otevře“ (**satelitový fenomén**). Takovou bakterií je například zlatý stafylokok
- Mají **droboučké kolonie**, proto se používá disk k odclonění ostatních bakterií (**bacitracin**, ale ve vyšší koncentraci než v bacitracinovém testu)

Satelitový fenomén

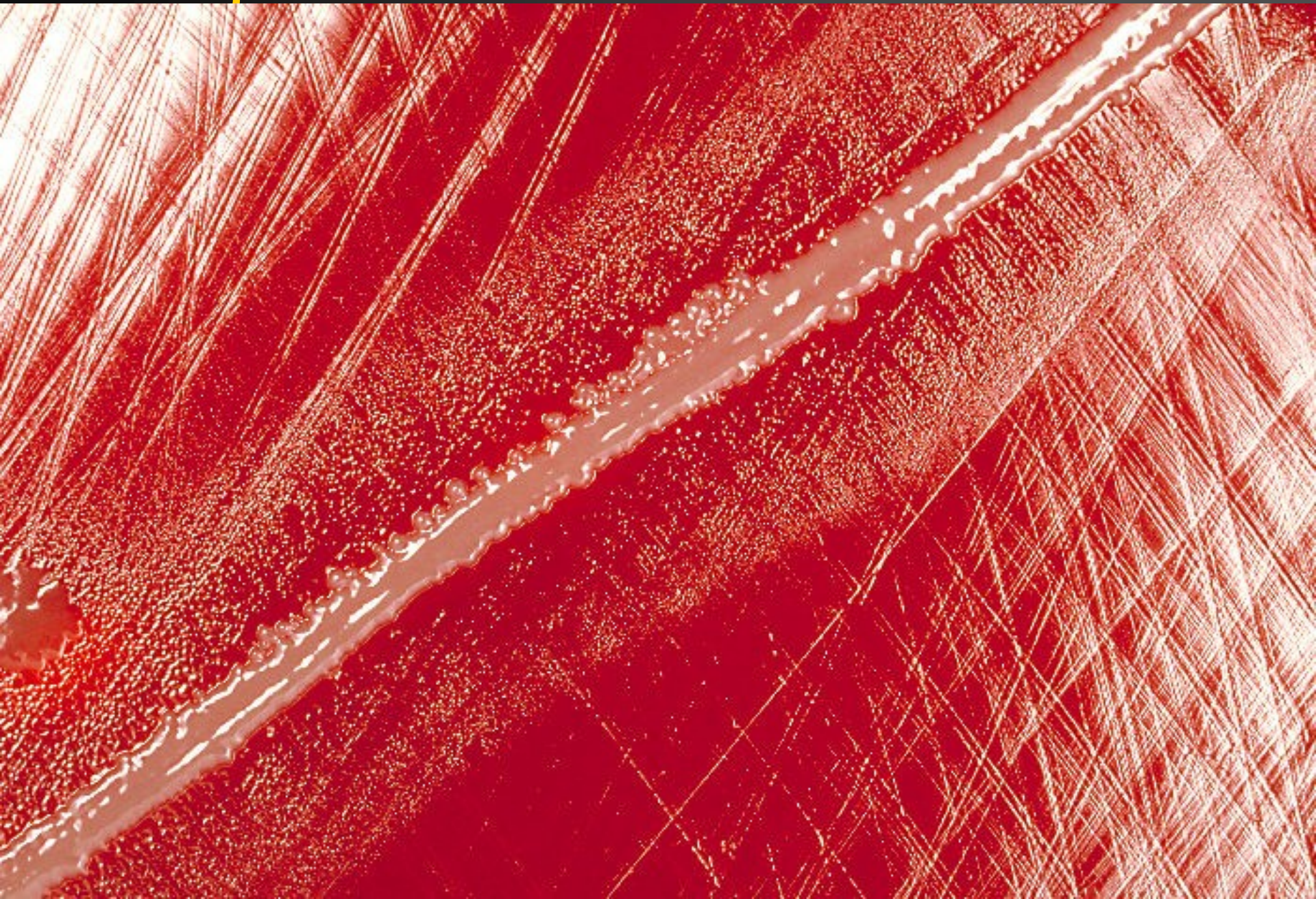
- Jak už víme, hemofily potřebují faktory z erytrocytů, ale nejsou samy schopny je narušit. Narušení může obstarat
 - zahřátí agaru (čokoládový agar)
 - přítomnost jiného mikroba
- **Satelitový fenomén** představuje tu druhou možnost, jak může hemofil získat faktory z krvinek. Znamená růst hemofila pouze kolem stafylokokové čáry.
- Přítomnost satelitového fenoménu je důkazem, že jde opravdu o příslušníka rodu *Haemophilus*

Hemofily – vlevo na čokoládovém agaru, vpravo jako satelit na KA



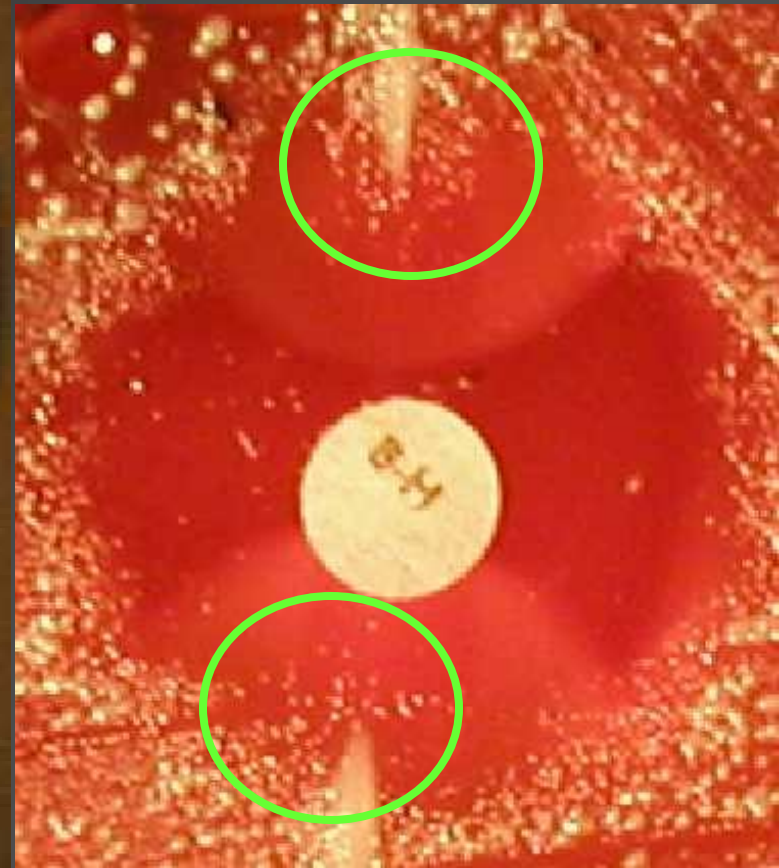
Ještě jednou satelit

<http://phil.cdc.gov>



Detekce hemofilů

Hemofily jsou rezistentnější než bakterie běžné flóry, takže rostou uvnitř zóny, ovšem jen kolem stafylokokové čáry (satelitový fenomén)



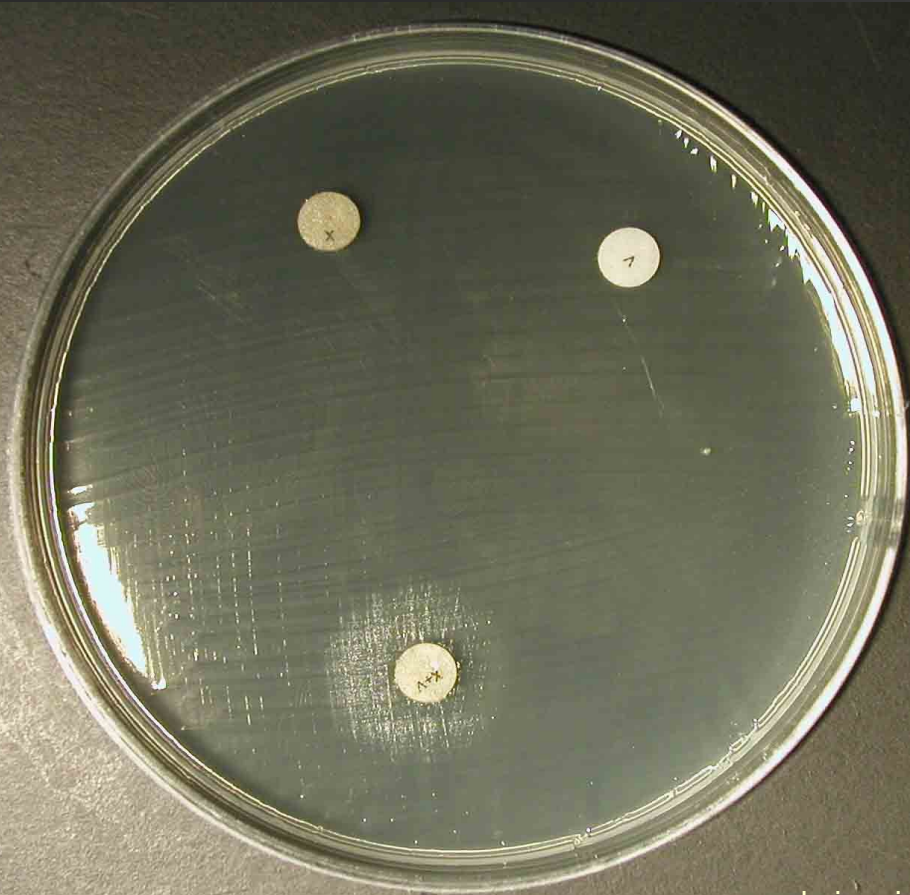
Růstové faktory hemofilů

- Hemofily vyžadují faktory z krvinek, avšak jejich potřeba konkrétních faktorů je specifická:
 - *H. parainfluenzae* vyžaduje faktor **V** (= NAD)
 - *H. aphrophilus* vyžaduje faktor **X** (= hemin)
 - *H. influenzae* vyžaduje **oba faktory**.
- Používáme disky s těmito faktory: jeden s faktorem **X**, druhý s **V**, a třetí se **směsí** obou.

Test růstových faktorů hemofilů

Jeden disk obsahuje faktor X, druhý faktor V, třetí směs obou

H. influenzae (vlevo),
H. parainfluenzae (vpravo)

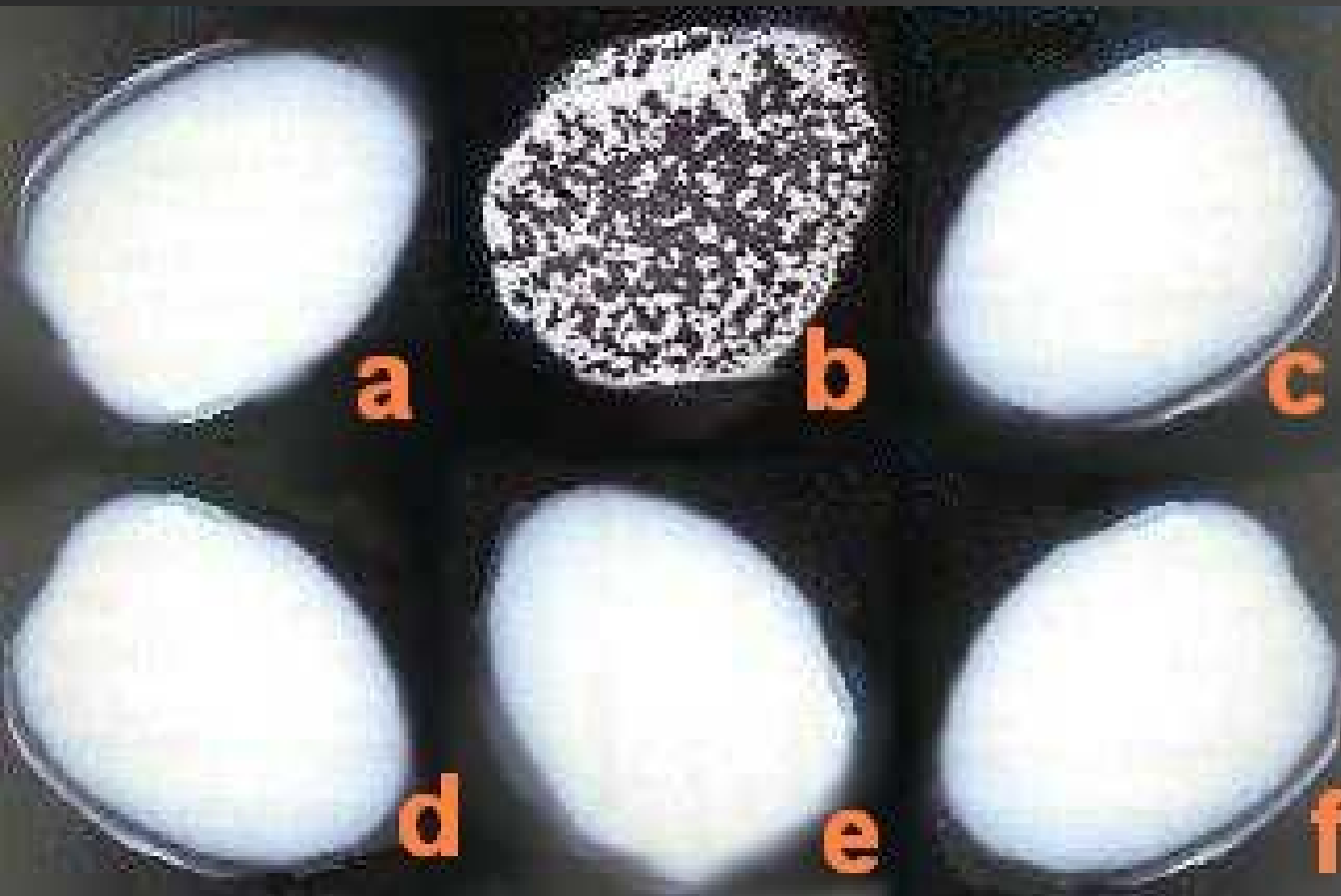


Antigenní analýza hemofilů

- Antigenní analýza se u hemofilů provádí obdobným způsobem jako u jiných bakterií. Dnes jsou zpravidla k dispozici **komerční soupravy**, obsahující např. i latexové částice a další součásti
- Dříve se využívalo jevu tzv. **koaglutinace se stafylokokem**, kdy aglutinát byl hustší díky navázání stafylokoka na Fc konec protilátky proti hemofilovi

Antigenní analýza hemofilů – demonstrace výsledku

Výsledek se odečítá obdobně jako jiné
aglutinační reakce.



Detekce druhu *Pasteurella* typickým vzorcem citlivosti

- **Žádné gramnegativní bakterie nejsou citlivé na vankomycin.** Vankomycin lze použít jen u grampozitivních, avšak zde je silný: všechny streptokoky a většina stafylokoků a enterokoků je citlivá.
- Na druhou stranu, **jen málo bakterií je citlivých na penicilin, zvláště mezi G-tyčinkami.**
- **Kombinace citlivosti k penicilinu a rezistence k vankomycinu je poměrně specifická pro rod *Pasteurella*.**

Testy antibiotické citlivosti

- Hemofily **nerostou** na MH agaru
- Zpravidla se používá **Levinthalův agar** (přefiltrovaný čokoládový agar), na kterém jsou zóny lépe viditelné než na klasickém čokoládovém agaru
- V naší laboratoři se používá „**hemofilový agar**“, což je půda blízká agaru Levinthalovu

Typická sestava antibiotik pro léčbu hemofilových infekcí



Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Ampicilin (aminopenicilin)	AMP	22 mm
Ko-amoxicilin (am.+inhib.)	AMC	18 mm
Cefuroxim (cefalosp. 2G)	CXM	20 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	29 mm
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	16 mm
Azithromycin (makrolid)	AZM	12 mm

Diagnostika gramnegativních nefermentujících bakterií

Přehled metod používaných u G–nefermentujících bakterií

■ Přímé metody

- **Mikroskopie** – většinou jsou to G– tyčinky, ale *Acinetobacter* je G– kok
- **Kultivace** – „nefermentující“ rostou na většině půd včetně krevního agaru. Jakožto glukózu nefermentující jsou většinou také laktózu nefermentující, ovšem kolonie některých z nich jsou kvůli pigmentaci poměrně tmavé
- **Biochemická identifikace** – možná, ale je potřeba použít testy, zjišťující aerobní respiraci (ne fermentaci). Je také nutno použít sníženou teplotu a prodlouženou inkubaci
- **antigenní analýza, detekce DNA** – rutinně se nepoužívají

Nepřímé metody se používají zřídka

Odlišení G– nefermentujících (diferenciální diagnostika)

- Gramovo barvení: **Gram– tyčinky** × jiné bakterie
- Endova půda: **rostou** (více později)
- Nefermentující se odliší od enterobakterií/vibrií tím, že nefermentují glukózu. Typické pro G– nefermentující je **chybění jakékoli změny na Hajnově půdě** (zůstává červená, případná nahnědlá barva nevadí, je dána přítomností pigmentů)

Bližší určení jednotlivých rodů a druhů G– nefermentujících

- **Pseudomonády** se zpravidla poznají:
 - Mají typickou **vůni** (mladé kultury)
 - Tvoří **pigmenty**, nejčastěji **zelené**, někdy modré či rezavé. Nejlépe jsou viditelné na MH, ale trochu i na KA či Endově agaru
 - Mají pozitivní **oxidázu**
- **Ostatní nefermentující**, případně sporné pseudomonády, musíme rozlišit biochemicky, například NEFERMtestem 24 (v kombinaci s oxidázovým testem)

Pseudomonády na MH agaru a ostatních půdách

- Uvědomte si, že MH agar je sám o sobě téměř bezbarvý, resp. lehce nažloutlý.
- Vše zelené, co vidíte na agaru, je výtvořem pseudomonády, resp. jejího pigmentu pyoverdinu
- Na KA a Endu se tvorba pigmentu projevuje méně, ale projeví se také. Na těchto půdách je zato typický perleťový lesk kolonií.

Oxidázový test u nefermentujících

- Z nejběžnějších G⁻ nefermentujících tyčinek má ***Pseudomonas* oxidázu pozitivní**, ***Burkholderia* zpravidla také**; ***Stenotrophomonas* většinou ne a *Acinetobacter* také nikoli.**



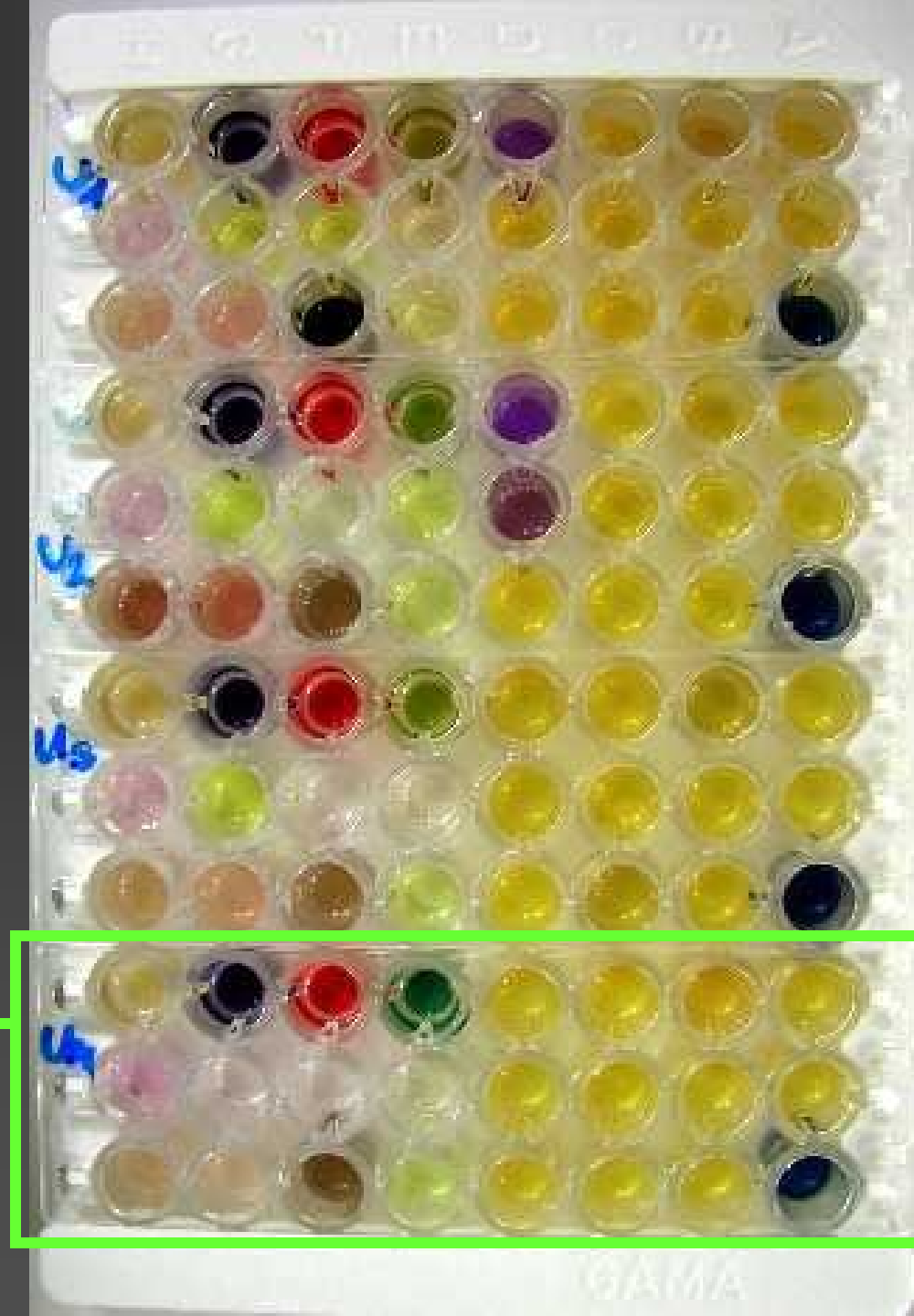
medic.med.uth.tmc.edu/path/oxidase.htm

NEFERMtest 24

- Pro přesnou biochemickou identifikaci G–nefermentujících užíváme většinou Nefermtest 24 (nebo podobný jiných výrobců).
- Je to trojstrip (ne dvojstrip jako minulý týden)
- Kód se tu tvoří poněkud jiným způsobem:
 - první číslice je 0 (oxidáza –) nebo 1 (oxidáza +)
 - dalších 6 číslic pochází ze sloupců H až C
 - sloupce B a A se nepočítají (používají se jen pro případné další rozlišení)

NEFERMtest 24

- Do jednoho rámečku lze vložit čtyři trojřádky pro čtyři kmeny, každý se identifikuje pomocí 24 reakcí



Atb citlivost nefermentujících

- G– nefermentující naopak **rostou ochotně na nejrůznějších médiích**
- Pro testování i léčbu používáme poměrně silná antibiotika, nevhodná pro léčbu infekcí způsobených běžnými bakteriemi
- Konkrétně se tu používají
 - **cefalosporiny 3. generace*** (ale jen některé, tzv. „protipseudomonádové“, jako je ceftazidim)
 - **protipseudomonádové peniciliny, monobaktamy a karbapenemy*** (imipenem, piperacilin/tazobactam)
 - **aminoglykosidy** (gentamicin, amikacin)
 - **fluorochinolony** (ciprofloxacin, ofloxacin)
 - **polypeptidy** (kolistin)

**a jejich kombinace s inhibitory betalaktamáz*

Typická sestava atb používaných proti nefermentujícím bakteriím

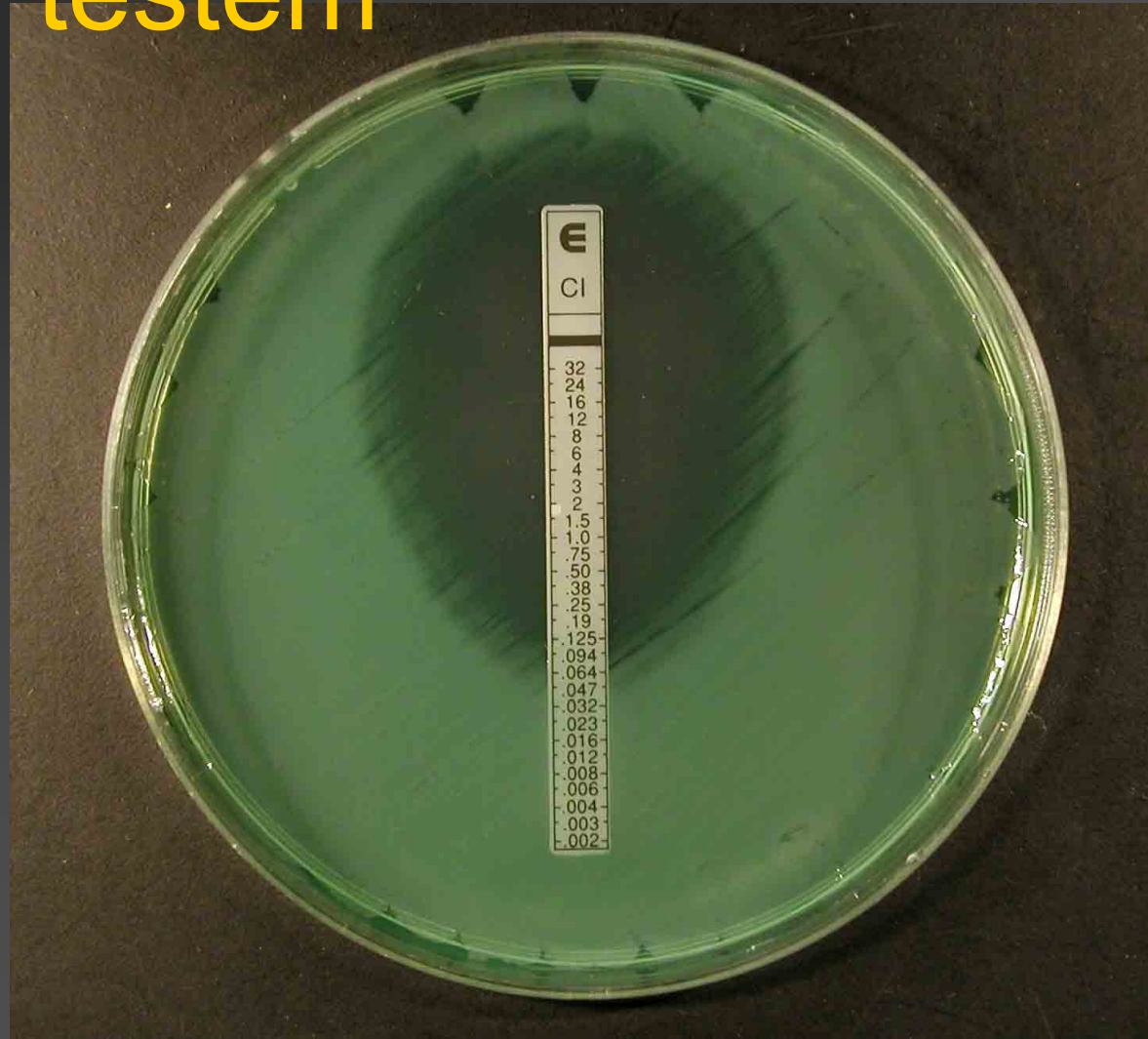
Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Piperacilin + tazobaktam*	TZP	22 mm
Gentamicin (aminoglykos.)	CN	18 mm
Imipenem (karbapenem)	IPM	22 mm
Ciprofloxacin (chin 3 gen)	CIP	29 mm
Ceftazidim (CS 3 gen)	CAZ	16 mm
Kolistin (polypeptid)	CT	12 mm
*protipseud. penicilin + inhibitor β -aktamázy		

Na obrázku je *Pseudomonas aeruginosa* pravděpodobně citlivá na všechna testovaná antibiotika; je to však možné jen proto, že jsou testována jen speciální protipseudomonádová léčiva. I tak se vyskytují polyrezistentní kmeny sekundárně rezistentní i k nim.

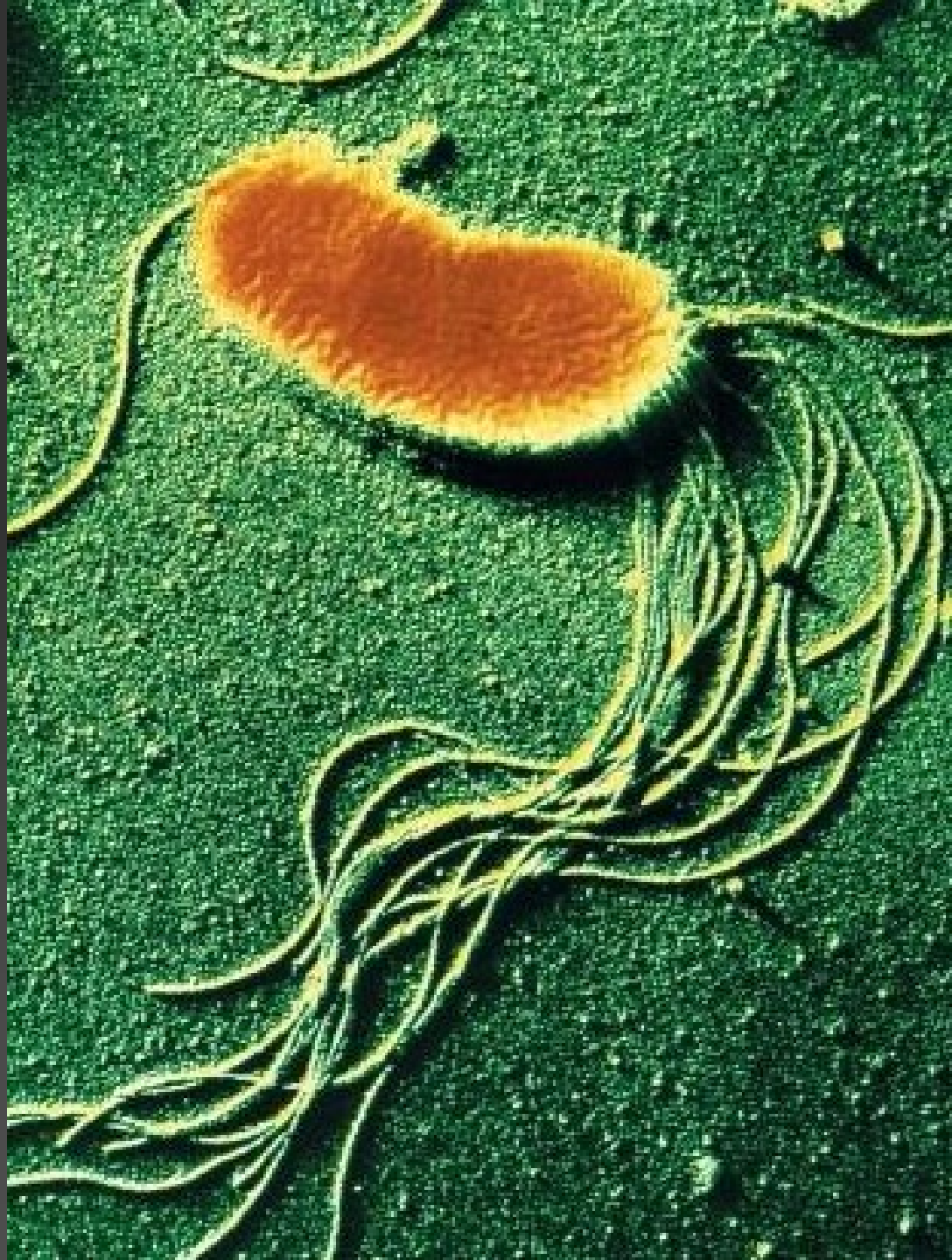
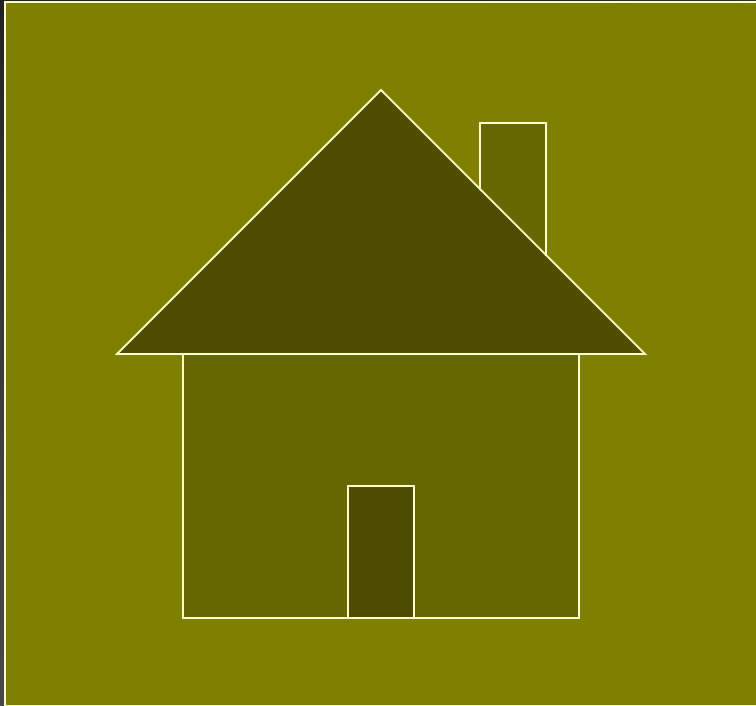


Zejména producenti takzvaných metalo-betalaktamáz (MBL) jsou často citliví jen na amikacin a kolistin

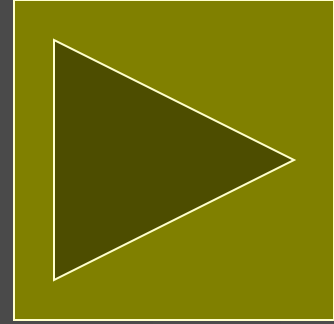
Testování citlivosti je možné i E-testem (na obrázku) nebo mikrodilučním testem



Konec



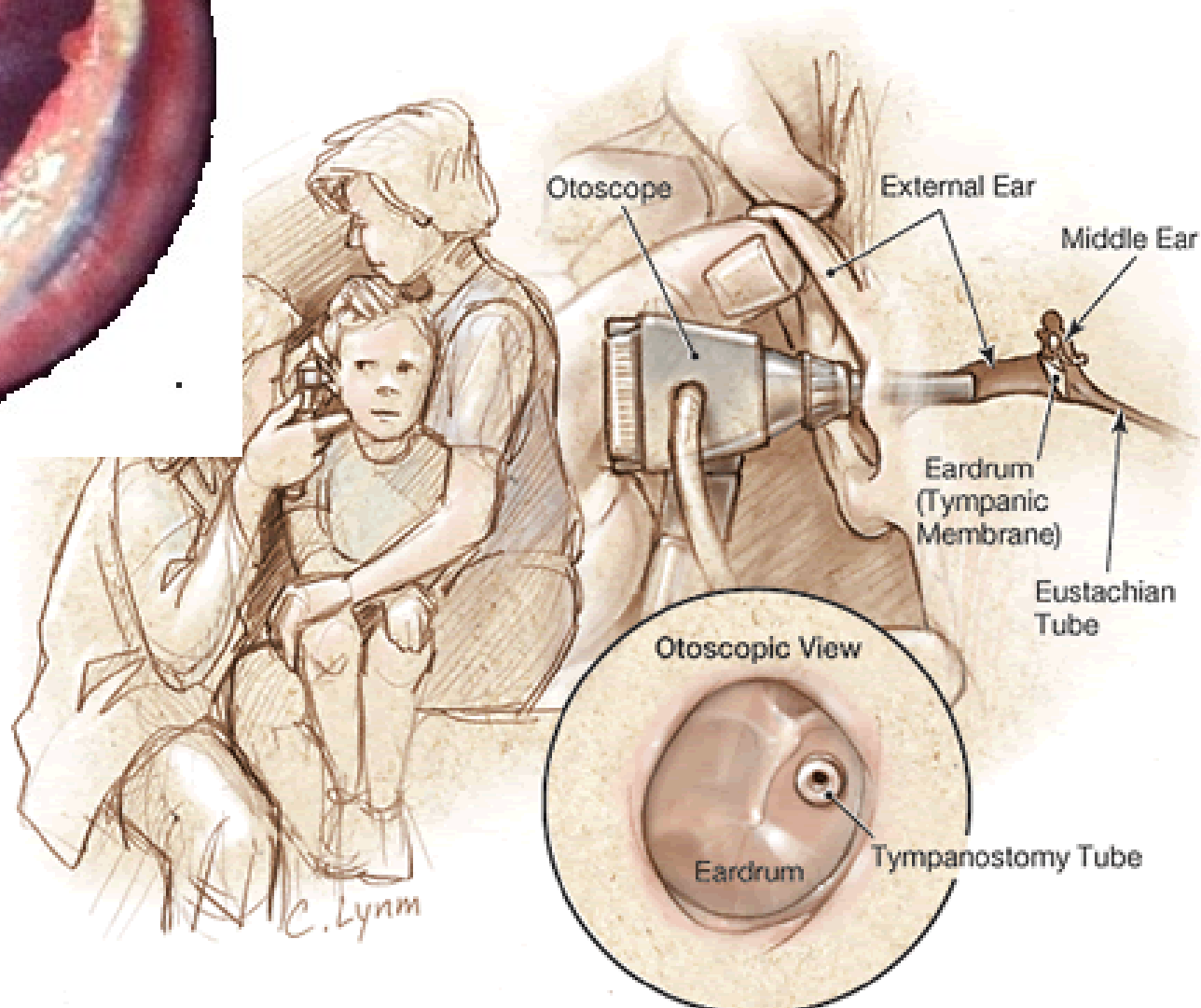
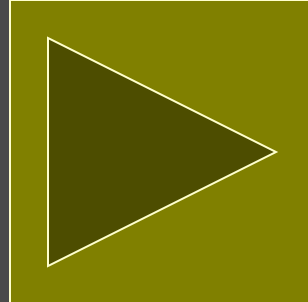
Zánět středního ucha – otitis media (bonus)



- **Častý u dětí** (krátká vodorovná Eustachova trubice)
- **Původci:** *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*
- **U chronických** se mohou uplatnit i některé gramnegativní tyčinky

Nutno odlišit záněty boltce a zevního zvukovodu: tady je původcem hlavně Staphylococcus aureus (jako u jiných zánětů kůže), léčba lokálně např. framykoin kapky

Otitis media



<http://www.otol.uic.edu/research/microtology/Microtology/acute1.htm>

http://www.medem.com/MedLB/article_detailb.cfm?article_ID=ZZZPMV6D1AC&sub_cat=544

C. Lynn

Vyšetřování a léčba infekcí středního ucha



- **Léčba** má smysl, pokud jde o skutečně prokázaný zánět (bolest, zarudnutí, horečka) a nereaguje na protizánětlivou léčbu
- **Lékem volby** je amoxicilin (např. AMOCLEN), alternativou může být ko-trimoxazol
- Vyšetřovat **výtěr ze zvukovodu** má smysl pouze po provedené paracentéze (propíchnutí bubínku)
- Jinak má samozřejmě smysl vyšetřit **hnisavou tekutinu**, která je při paracentéze odebrána