

P05

**Diagnostika *Pasteurellaceae*
a G- nefermentujících tyček**

Osnova

- čeleď *Pasteurellaceae*
- zástupci gramnegativních nefermentujících bakterií (GNFB)
- diagnostika *Pasteurellaceae* a GNFB
- úkoly

Pasteurellaceae

- čeleď **G- tyček**, většinou **fakultativně anaerobní**, **OXI+**
- **komenzálové na sliznicích** savců a ptáků, hlavně **HCD**
- rody: *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, ...
- změny v nomenklatuře: od roku 2006 **nový rod** ***Aggregatibacter*** (obsahuje *A. actinomycetemcomitans*, původně *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a *A. aphrophilus* , původně *Haemophilus aphrophilus*)

Pasteurella multocida

- **G– pleomorfní kokobacil, OXI+, KAT+**
- **roste na KA, neroste na ENDO**
- patogenní pro skot, ovce a drůbež; **nepatogenní pro psy a kočky → infekce po kousnutí**
- **infekce ran s komplikacemi** (abscesy, celulitida, osteomyelitida, ...), **pneumonie, endokarditidy, ...**
- **citlivá na penicilin** (u G – bakterií nezvyklé), **rezistentní na vankomycin**



Rod *Haemophilus*

- **drobné pleomorfní G- tyčky**, fakultativně anaerobní
- **kultivačně náročné**, potřebují k růstu **faktor X** (hemin) a/nebo **faktor V** (NAD)
 - faktor X (hem) nutný pro funkci respiračních enzymů, katalázy, peroxidázy apod.
 - faktor V (NAD) nutný pro oxidačně redukční procesy v buňce
 - **hynou při chladničkové teplotě** → důsledky pro transport a zpracování vzorků
- **na sliznicích člověka i zvířat** (nosohltan), většina se považuje za normální mikroflóru

Rod *Haemophilus* (vybraní zástupci)

- *Haemophilus influenzae*
 - pouzderný typ b (Hib) – hexavakcína
 - **epiglottidy**, pneumonie, sinusitidy, faryngitidy, ...
 - pouzderné typy a, c, d, e, f
 - lokalizované infekce respiračního traktu
 - neopouzdržené kmeny (nízká patogenita)
- *Haemophilus parainfluenzae* (běžnější a méně patogenní)
- *Haemophilus aphrophilus* (lehké infekce HCD)
- *Haemophilus ducreyi* (pohlavně přenášená choroba **ulcus molle**)

Ulcus molle

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



- **ulcus molle** – měkký vřed (chancroid/šankroid) – způsoben *Haemophilus ducreyi*, **bolestivé**
- **ulcus durum** – tvrdý vřed (chancre/šankr) – jeden z příznaků syfilis, způsobené *Treponema pallidum*, **nebolestivé**

Skupina HACEK

- skupina G– bakterií způsobující bakteriální endokarditidy
- obsahuje některé zástupce čeledi *Pasteurellaceae*:
 - *Haemophilus parainfluenzae*, *H. paraphrophilus*
 - *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*
- další členové jiných čeledí:
 - *Cardiobacterium hominis*
 - *Eikenella corrodens*
 - *Kingella kingae*

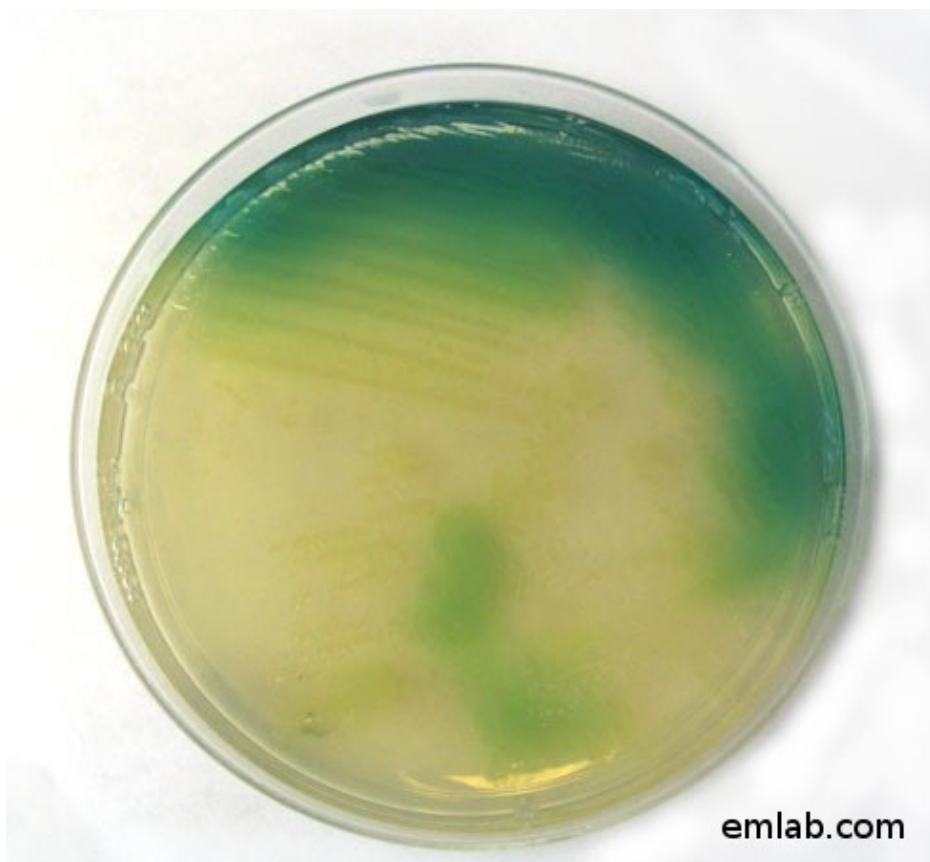
G- nefermentující bakterie

- **nesourodá skupina G- tyček**
- **neschopnost fermentovat glukózu** (ale mohou ji štěpit aerobně!)
- nejdůležitější rody ***Pseudomonas, Acinetobacter, Burkholderia, Stenotrophomonas***, dále např. *Bordetella, Eikenella, Kingella, Moraxella, ...*
- **adaptovány na vnější prostředí, často rostlinné patogeny** (aerobní respirace, pigmentace, nižší teplotní optimum okolo 30 °C)
- patogenita obecně nízká (kromě oslabených osob, tj. imunokompromitovaní, dlouhodobě hospitalizovaní, popáleniny, ...)
- **nozokomiální infekce zejm. respiračního traktu**

Pseudomonas aeruginosa

- **G– tyčky, aerobní, OXI+, KAT+, typická zelená pigmentace** (lat. *aerugo* – měděnka), **typický zápach po jasmínu**, starší kultury po amoniaku, pestrá biochemická aktivita
- **napadá oslabené jedince (popáleniny, imunosuprese, jiná závažná onemocnění jako diabetes, cystická fibróza, ...)**
- **zdravé lidi může kolonizovat → vektor šíření nozokomiálních nákaz**
- nejhorší prognózy u **infekcí popálenin, sepsí novorozenců, osteomyelitidy a devastujících infekcí oka (proteolytické enzymy)**
- **časté rezistence, protipseudomonádová ATB**

Pseudomonas aeruginosa (2)



Typický kmen pseudomonády
se **zeleným pigmentem**



Výjimečný kmen pseudomonády
s **modrým pigmentem**

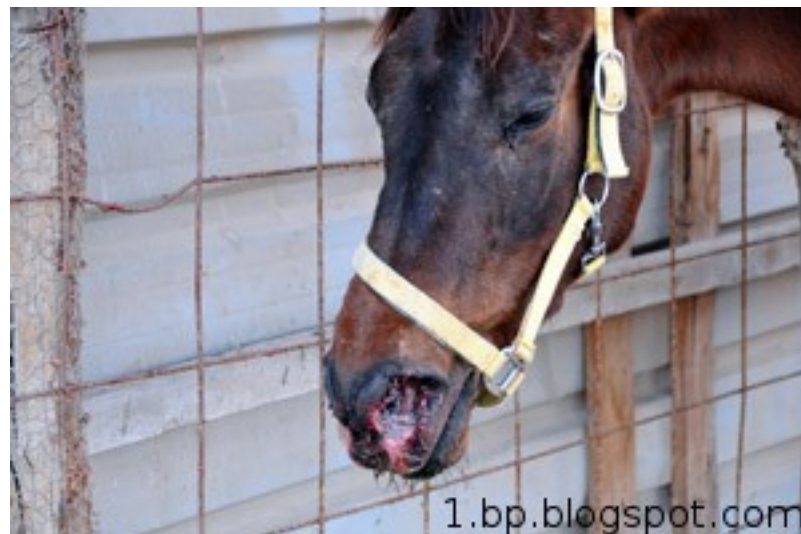
Rod *Burkholderia*

- ***Burkholderia cepacia***
 - **nozokomiální nákazy** (především dýchacích cest, **pacienti s cystickou fibrózou**)
- **pacienti s cystickou fibrózou časté (i trvalé) záněty dýchacích cest, nejčastěji:**
 - ***Pseudomonas aeruginosa***
 - ***Staphylococcus aureus***
 - ***Haemophilus influenzae***
 - ***Burkholderia cepacia***
 - ***Aspergillus sp.***

Rod *Burkholderia* (2)

- *Burkholderia mallei*

- **vozhřivka (malleus)**
- **lymfadenopatie se sepsí**
- výskyt u koní, oslů a ovcí
- v případě přenosu na člověka **fatální**



- *Burkholderia pseudomallei*

- melioidóza (pseudomalleus) – **často bezpříznakově**, v případě klinické manifestace **sepsy** (neléčená má mortalitu 95 %)

Další GNFB

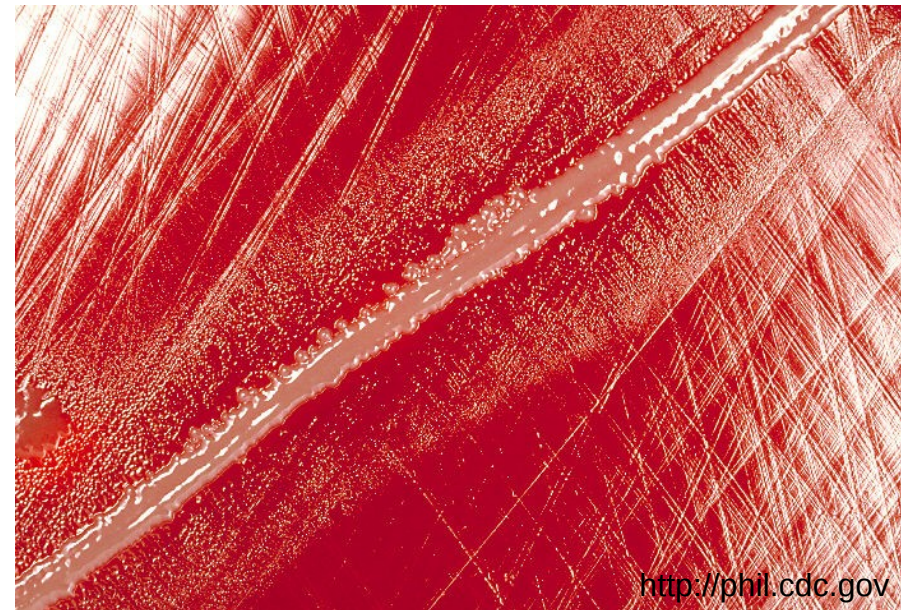
- **rod *Acinetobacter* (OXI–)**
 - *A. baumannii* – nozokomiální infekce, respirátorové pneumonie, sepse
- **rod *Stenotrophomonas* (OXI–)**
 - ***S. maltophilia*** – u oslabených **nozokomiální infekce s vysokou mortalitou** (časté rezistence na ATB)

Diagnostika hemofilů a pasteurel

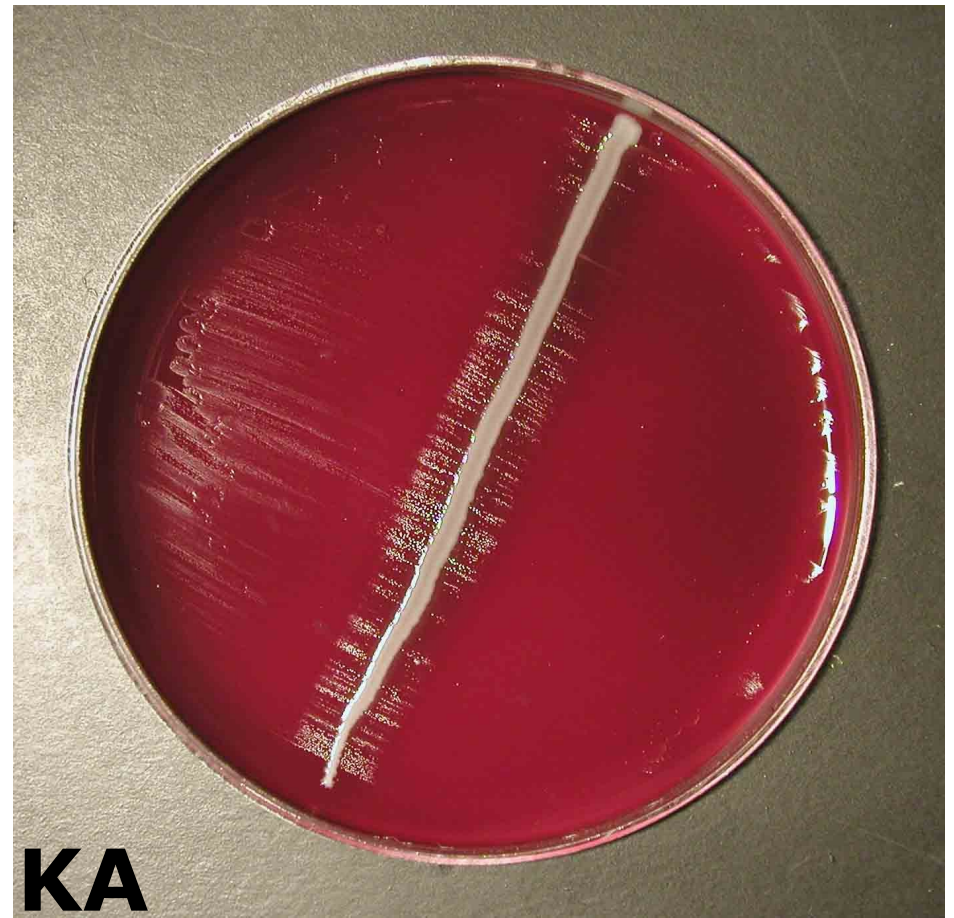
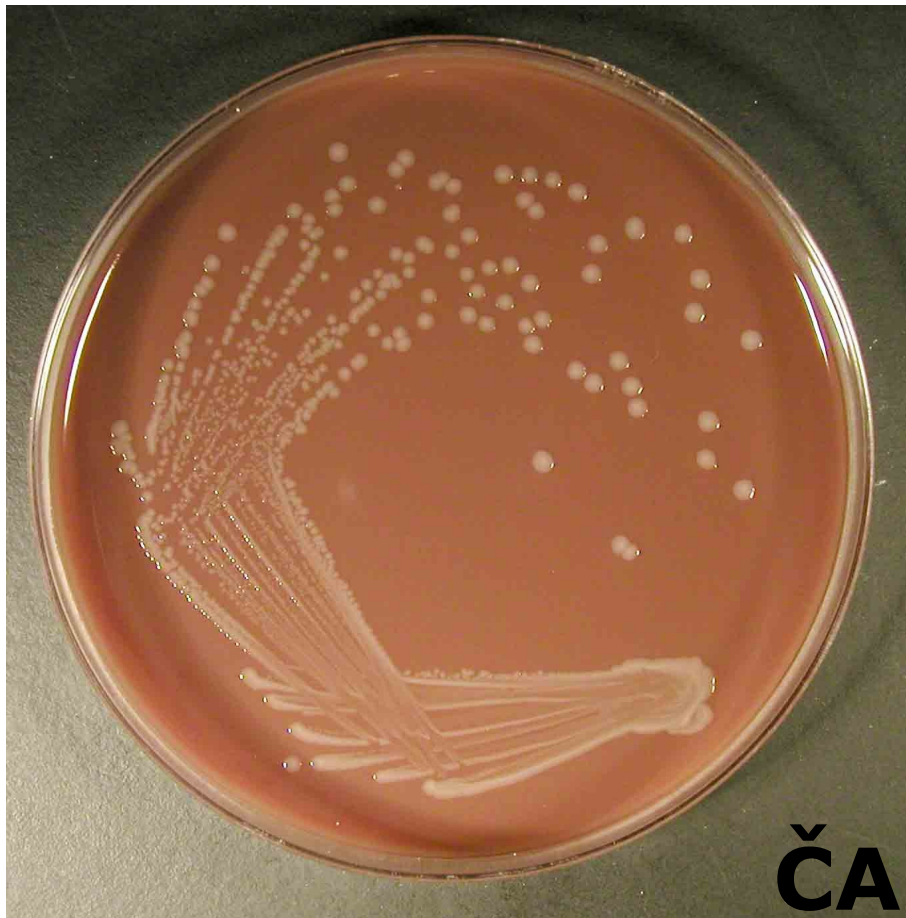
- **přímé metody**
 - **mikroskopie** – krátké G- tyčky
 - **kultivace** – **pasteurely nerostou na Endově agaru** (rostou *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* a GNFB), **hemofily ani na obyčejném KA, používámě čokoládový nebo Levinthalův agar (testy ATB citlivosti)** (s výjimkou současné kultivace s jiným mikroblem – satelitový fenomén); typický zápach nebo citlivost k ATB
 - biochemická identifikace – možné ji použít
 - **antigenní analýza** – **u hemofilů** (Hib)
 - detekce DNA – rutinně se nepoužívá
- **nepřímé metody** se téměř **nepoužívají**

Satelitový fenomén

- **hemofily potřebují růstové faktory z erytrocytů**
- **nejsou samy schopny je narušit** → narušit je může **přítomnost dalšího mikroba** (zlatý stafylokok s hemolýzou) nebo je **narušíme laboratorně** (čokoládový, Levinthalův agar apod.)
- **růst hemofila pouze okolo stafylokokové čáry** (popř. se užívá bacitracinový disk ve vyšší koncentraci k odclonění ostatních bakterií)

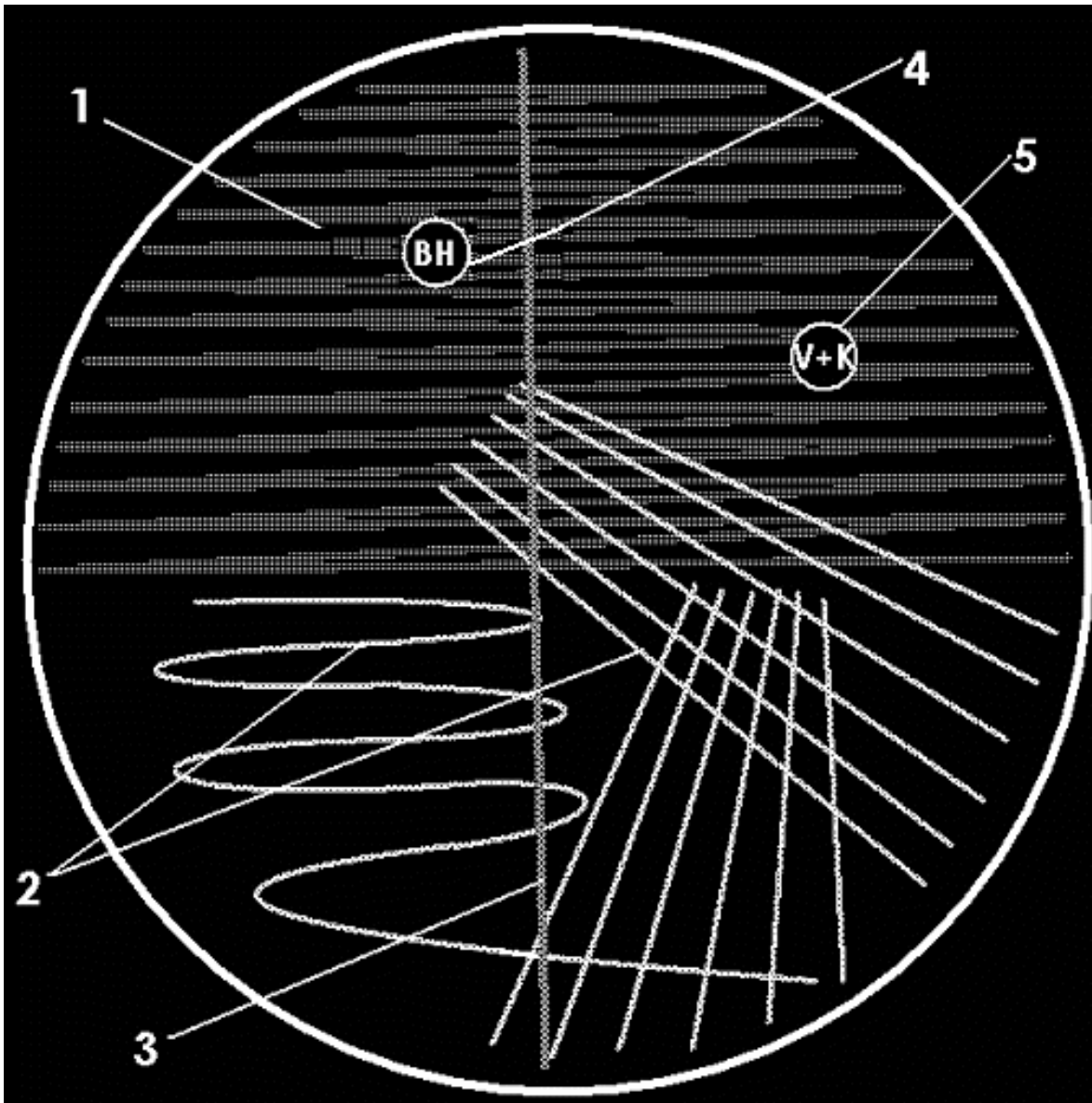


Růst hemofilů na ČA a KA



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

Vyhledávání respiračních patogenů



- 1) očkováno tamponem
- 2) očkováno kličkou
- 3) stafylokoková čára
- 4) disk BH (bacitracin pro hemofily)
- 5) disk V+K (vankomycin a kolistin pro meningokoky)

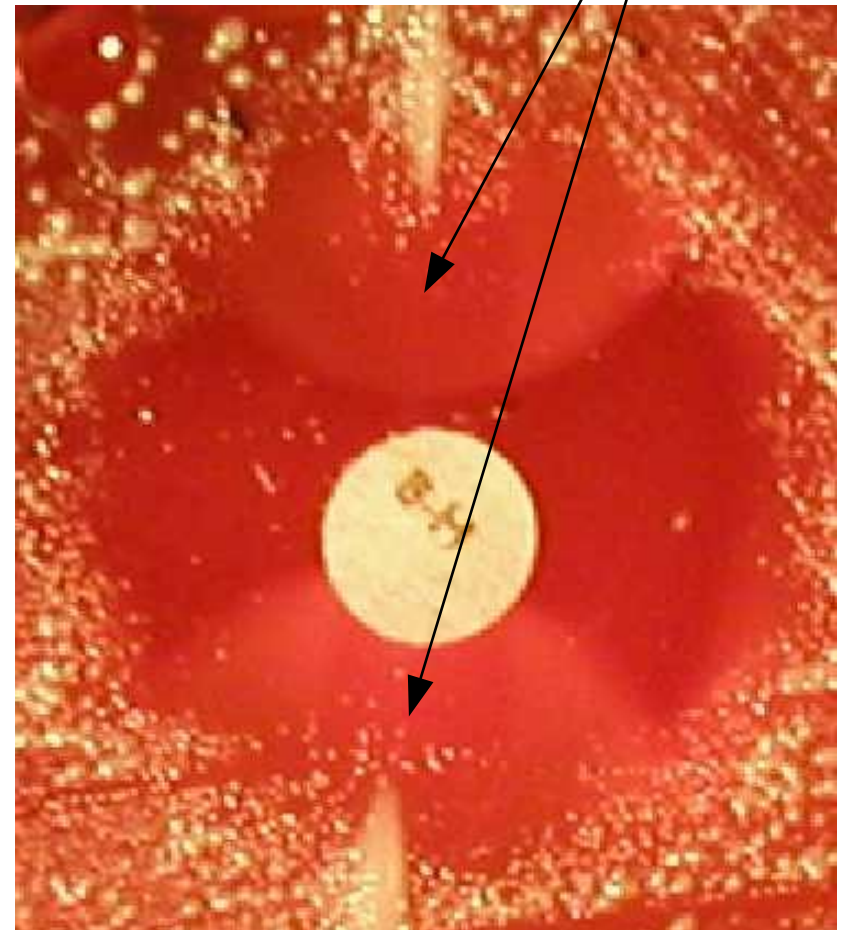
na celé naočkované ploše pátráme po hemolytických streptokokích (bezbarvé) a po stafylokokích (spíše bílé či zlatavé)

Vyhledávání respiračních patog. (2)

bacitracinový disk může být umístěn buďto na stafylokokovou čáru, nebo cca 1 cm od ní, používají se oba způsoby



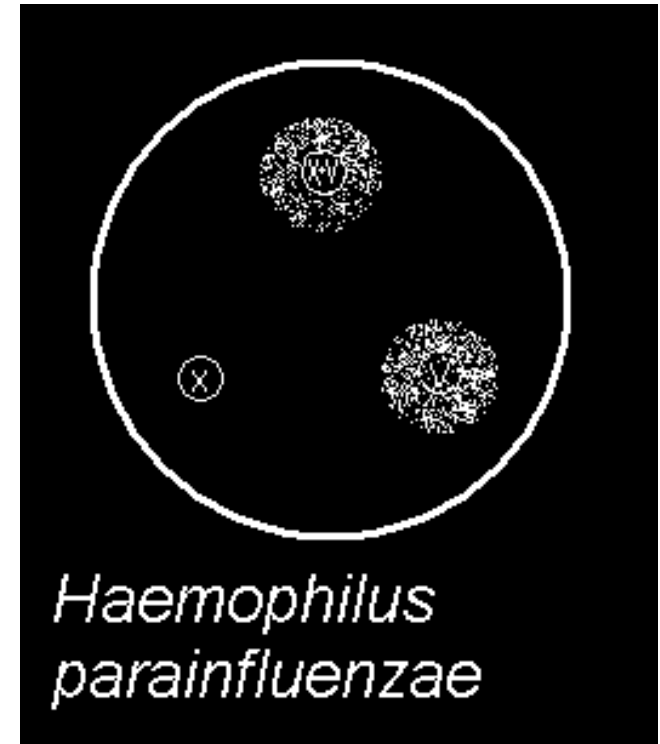
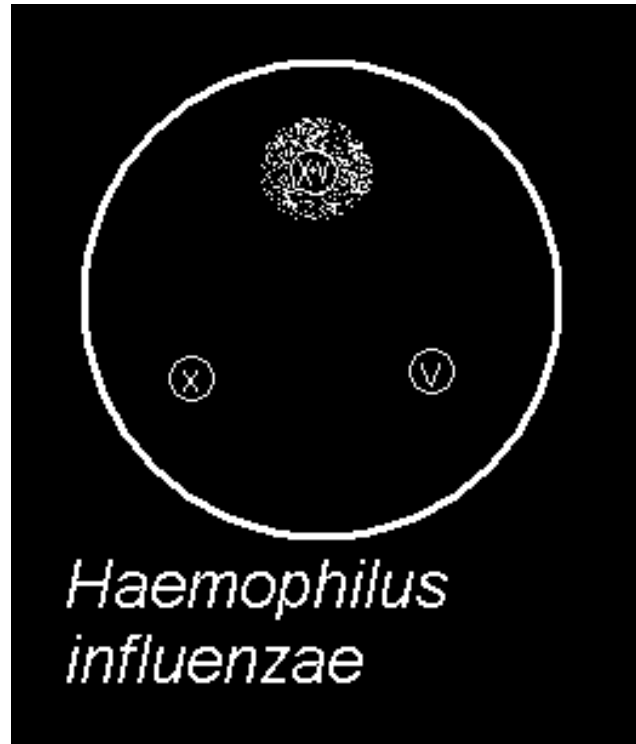
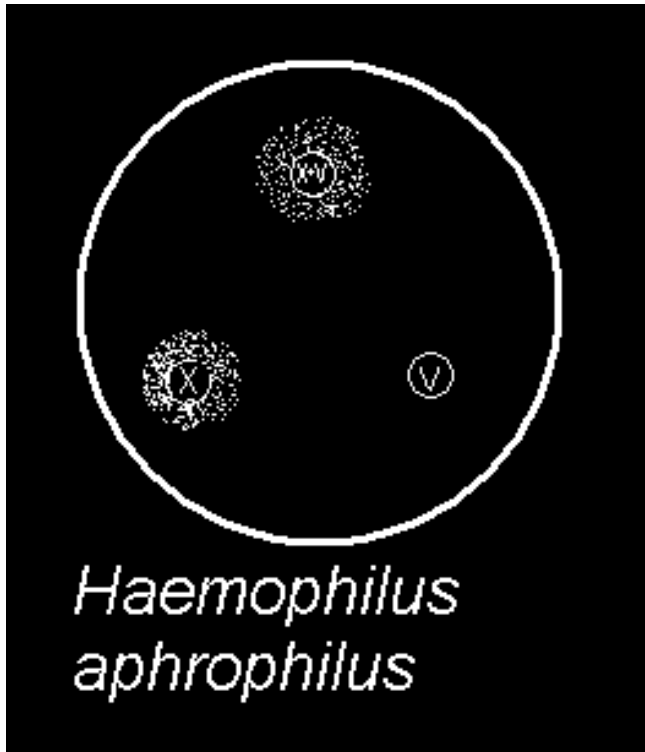
v těchto místech hledáme hemofily



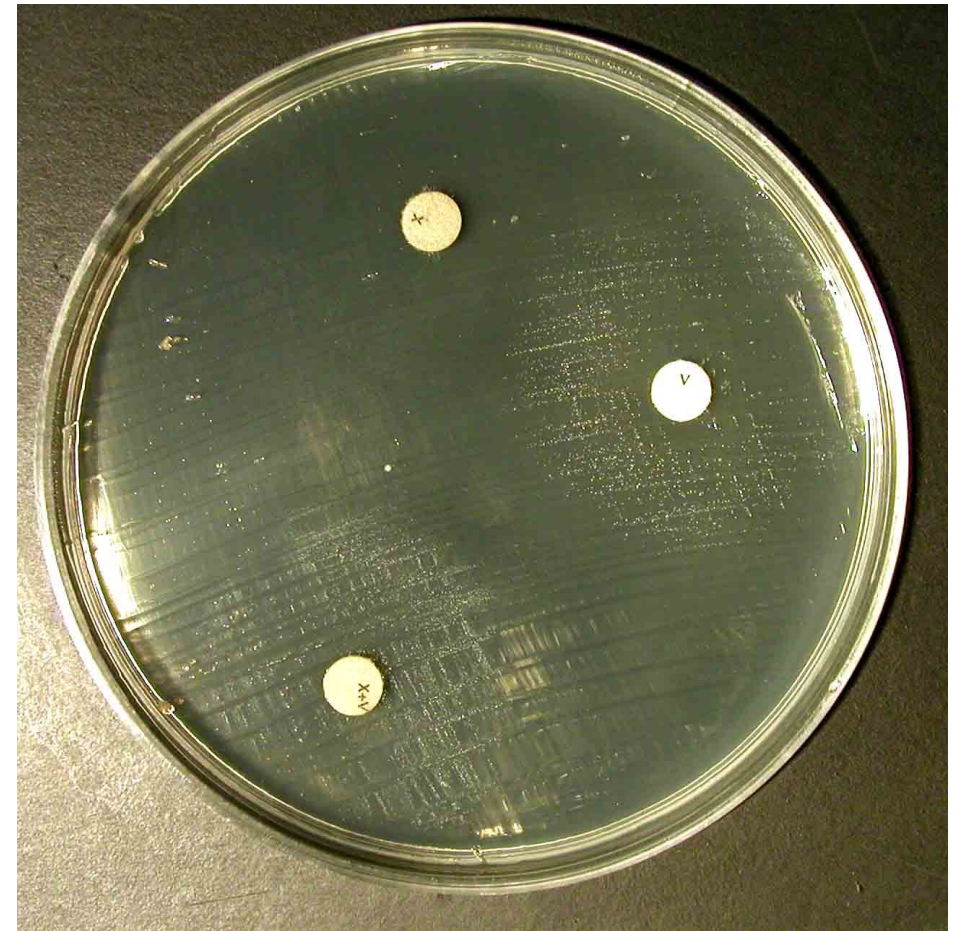
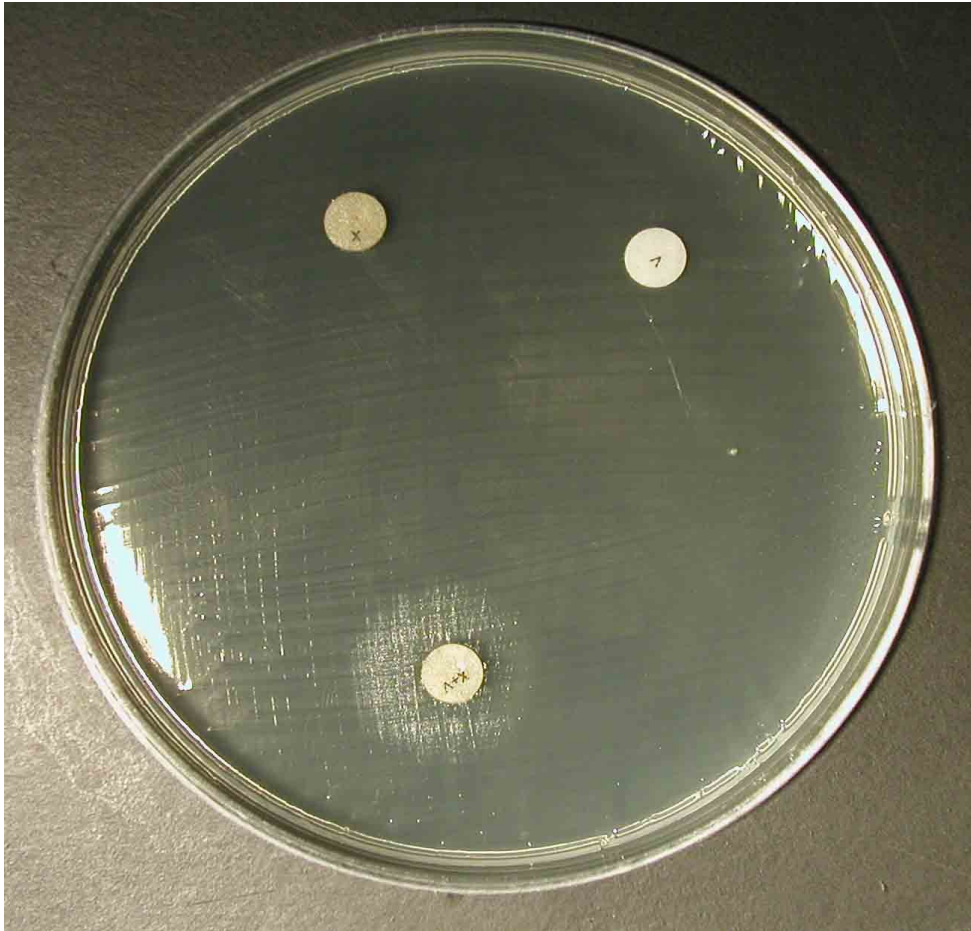
Růstové faktory hemofilů

- **specifické potřeby růstových faktorů hemofilů:**
 - *H. parainfluenzae* faktor V (NAD)
 - *A. (H.) aphrophilus* faktor X (hemin)
 - *H. influenzae* oba faktory (X+V)
- **používáme disky s těmito faktory:**
 - jeden s faktorem X
 - druhý s faktorem V
 - třetí se směsí X a V

Růstové faktory hemofilů (2)



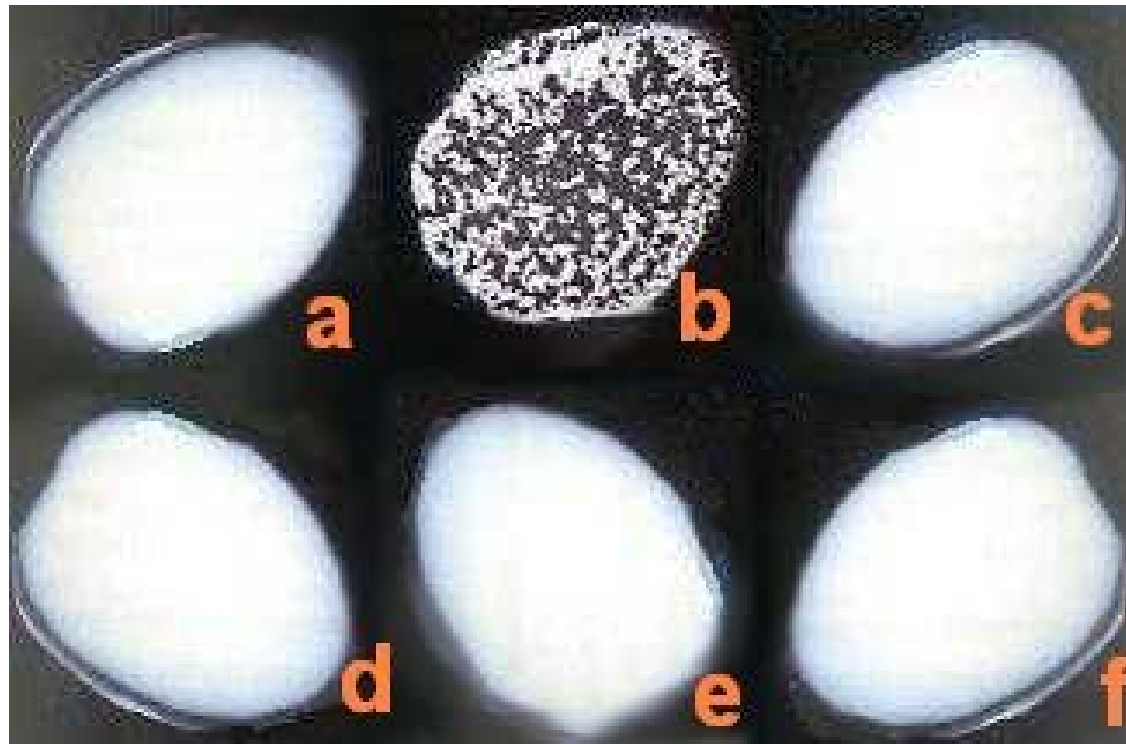
Růstové faktory hemofilů (3)



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

Antigenní analýza hemofilů

- **dnes komerční soupravy pro analýzu**
- dříve se využívalo jevu tzv. koaglutinace se stafylokokem, kdy aglutinát byl hustší díky navázání stafylokoka na F_c konec protilátky proti hemofilovi



Citlivost rodu *Pasteurella* k ATB

- **G– bakterie nejsou citlivé na vankomycin**
- vankomycin lze použít jen u G+ (všechny streptokoky a většina stafylokoků a enterokoků je citlivá)
- **málo bakterií je citlivých na penicilin**, obzvláště mezi G– tyčinkami
- **kombinace citlivosti k penicilinu a rezistence k vankomycinu** poměrně specifická pro rod *Pasteurella*

Diagnostika GNFB

- **přímé metody**
 - mikroskopie – **G- tyčky, *Acinetobacter* je G- kok**
 - kultivace – **rostou na většině půd vč. KA a ENDO** (nefermentují Glc a většinou ani Lac → tmavé zbarvení kolonií na ENDO je dané případným pigmentem)
 - **biochemická identifikace** – možná, ale je potřeba použít testy, zjišťující aerobní respiraci (ne fermentaci); nutno použít sníženou teplotu a prodlouženou inkubaci
 - antigenní analýza, detekce DNA – rutinně se nepoužívají
- **nepřímé metody** se používají **zřídka**

Diferenciální diagnostika GNFB

- **pseudomonády:**
 - typická **vůně** (mladé kultury)
 - tvoří **pigmenty** (nejčastěji zelené – pigment pyoverdin, někdy modré či rezavé), nejlépe viditelné na MH (na KA a ENDO perleťový lesk kolonií)
 - **OXI+**
- **ostatní nefermentující**, (případně sporné pseudomonády) rozlišíme **biochemicky**
 - např. NEFERMtestem 24 (v kombinaci s oxidázovým testem)

Oxidázový test GNFB

- *Pseudomonas* **OXI+**
- *Burkholderia* většinou **OXI+**
- *Stenotrophomonas* většinou **OXI-**
- *Acinetobacter* **OXI-**

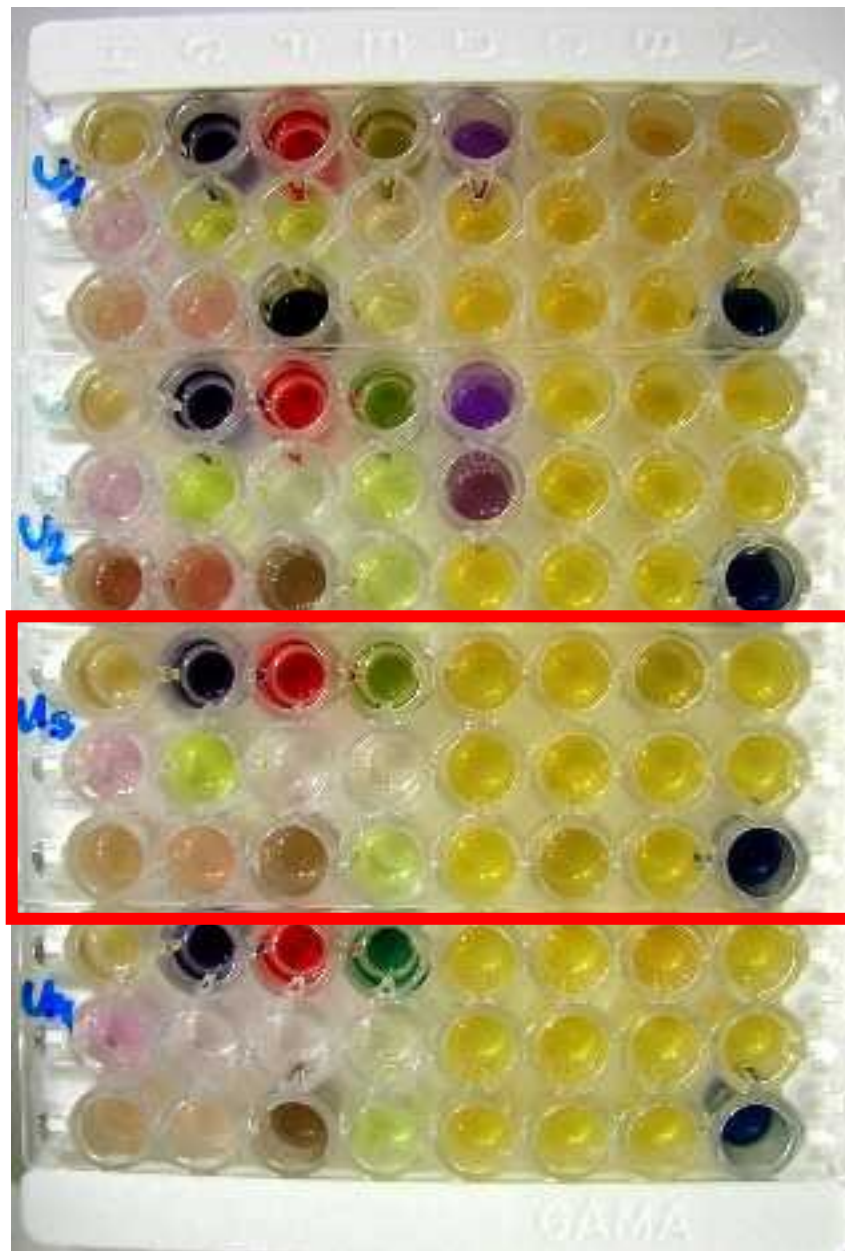


NEFERMtest 24

- **pro biochemickou identifikaci GNFB** užíváme většinou Nefermtest 24 (nebo podobný jiných výrobců)
- **24 reakcí** (trojstrip)
- **kód se tu tvoří jiným způsobem:**
 - první číslice je 0 (OXI–) nebo 1 (OXI+)
 - dalších 6 číslic pochází ze sloupců H až C
 - sloupce B a A se nepočítají (používají se jen pro případné další rozlišení)

NEFERMtest 24 (2)

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



Citlivost GNFB k ATB

- GNFB rostou ochotně na nejrůznějších médiích
- pro testování i léčbu používáme poměrně silná antibiotika, nevhodná pro léčbu infekcí způsobených běžnými bakteriemi
 - **cefalosporiny 3. generace*** (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*

Úkol 1: Mikroskopie suspektních kmenů

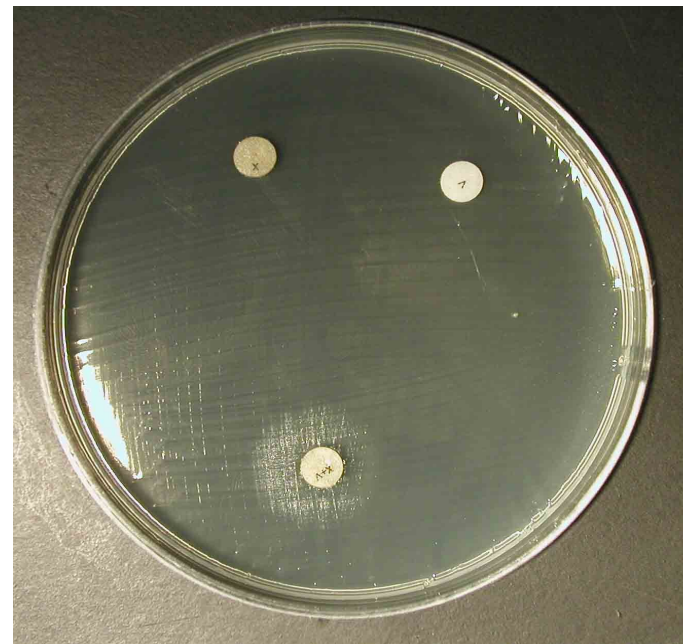
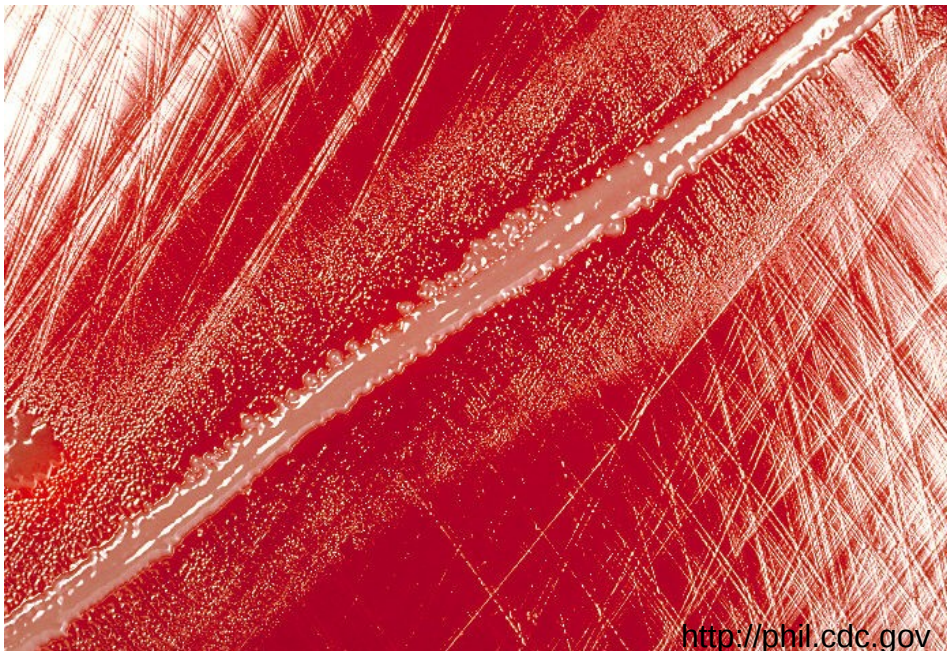
- obarvete kmeny podle Grama a do tabulky vepište výsledky
- kmen, který není G- tyčka, nebude studován v úkolech 3 až 5

Úkol 2: Kultivace na agarových půdách

- popište kolonie na KA, pokud na KA nerostou, popište je na ČA
- popište růst na ENDO
- zhodnoťte nárůst na MH agaru (pigmentace)

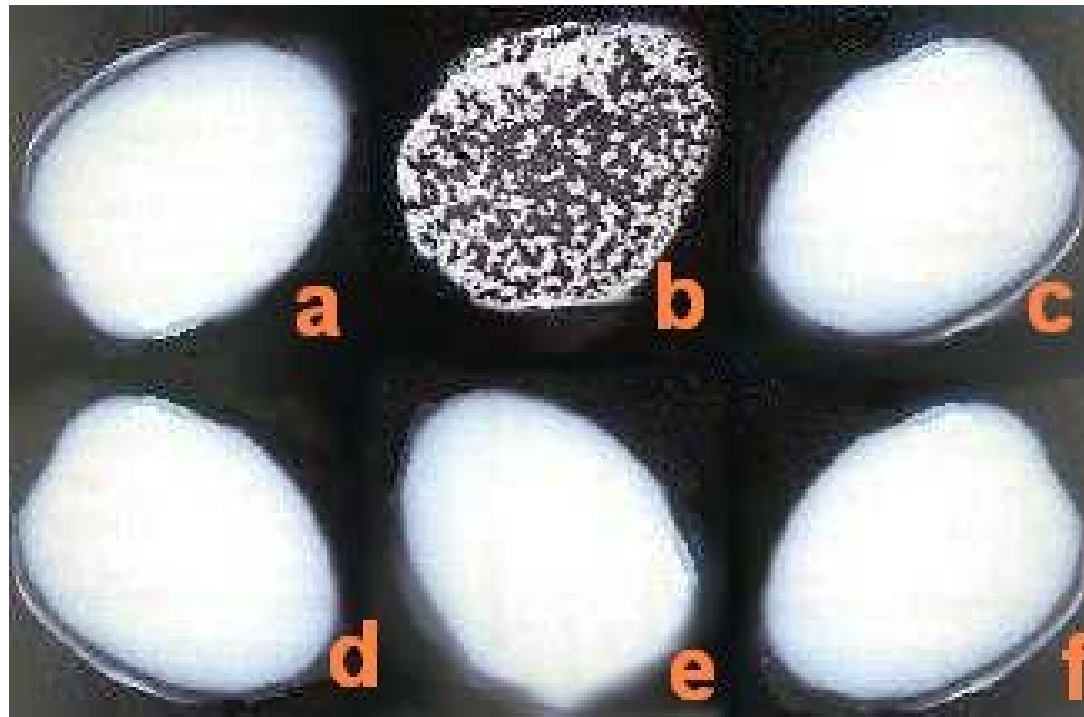
Úkol 3: Identifikace *Pasteurellaceae*

- **úkol 3a: Satelitový fenomén** (zakreslete a popište, jak vypadá satelitový fenomén)
- **úkol 3b: Identifikace hemofilů** podle potřeby růstových faktorů (určete kmeny podle potřeby různých růstových faktorů)



Úkol 3: Identifikace *Pasteurellaceae*

- **úkol 3c: Detekce kapsulárních antigenů *H. influenzae***



koláž s použitím:
www.microbes-edu.org

- **úkol 3d: Detekce *P. multocida* pomocí typického vzorce citlivosti** (citlivé k penicilinu, rezistentní k vankomycinu)

Úkol 4: Hajnova půda

Úkol 5a: Oxidázový test

- kmen, který fermentuje glukózu (žlutá barva) označte jako „+“, kmeny nefermentující (červená) jako „-“
- **oxidáza:**
 - ***Pseudomonas* OXI+**
 - ***Burkholderia* většinou OXI+**
 - ***Stenotrophomonas* většinou OXI-**
 - ***Acinetobacter* OXI-**
- ***Pseudomonas* (pigment, typická vůně, OXI+)**

Úkol 5b: Podrobné biochemické testování (NEFERMtest 24)

- vyhodnoťte předložené výsledky NEFERMtestu 24
- kultivace 2 dny při 30 °C
- **sedmimístný kód:**
 - **první číslice** je 0 (OXI-) nebo 1 (OXI+)
 - **dalších 6 číslic pochází ze sloupců H až C**
 - sloupce B a A se nepočítají (používají se jen pro případné další rozlišení)

Úkol 6: Testy citlivosti patogenů na antibiotika

- **úkol 6a: Test pro hemofila**
- **úkol 6b: Test pro pasteurellu**
- **úkol 6c: Test pro pseudomonádu**
- **úkol 6d: Kontrola primárních rezistencí u kmenů burkholderie a stenotrofomonády** (pouze na bočním stole)

Úkol 7: Vztahy bakterií ke kyslíku

- **porovnejte růst bakterií v bujónech** (masopeptonový a VL bujón) kultivovaných za aerobních a anaerobních podmínek
- **GNFB jsou striktně aerobní**
- ***Enterobacteriaceae* fakultativně anaerobní**
- **anaeroby striktně anaerobní**

Po tomto cvičení byste měli umět:

- popsat nejdůležitější zástupce čeledi *Pasteurellaceae* a nejvýznamnější zástupce gramnegativních nefermentujících bakterií (GNFB), vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- vysvětlit použití ATB a typické vzorce citlivosti čeledi *Pasteurellaceae* a GNFB
- vysvětlit co je satelitový fenomén a na základě čeho vzniká
- využít specifické růstové faktory pro rozlišení hemofilů