



DALŠÍ G- BAKTERIE

praktikum č. 5

Lékařská mikrobiologie – cvičení
Mikrobiologický ústav LF MU

Přehled G- bakterií

Cvičení č.	Endo	Skupina
P04	roste	Enterobacteriaceae (GLC +, OXI -)
P04	roste	Vibrionaceae (GLC +, OXI +)
P04	neroste	<i>Campylobacter</i> a <i>Helicobacter</i>
P05	roste	G- nefermentující bakterie (GLC -)
P05	neroste	<i>Pasteurellaceae</i>
P05	neroste	Další G- tyčinky



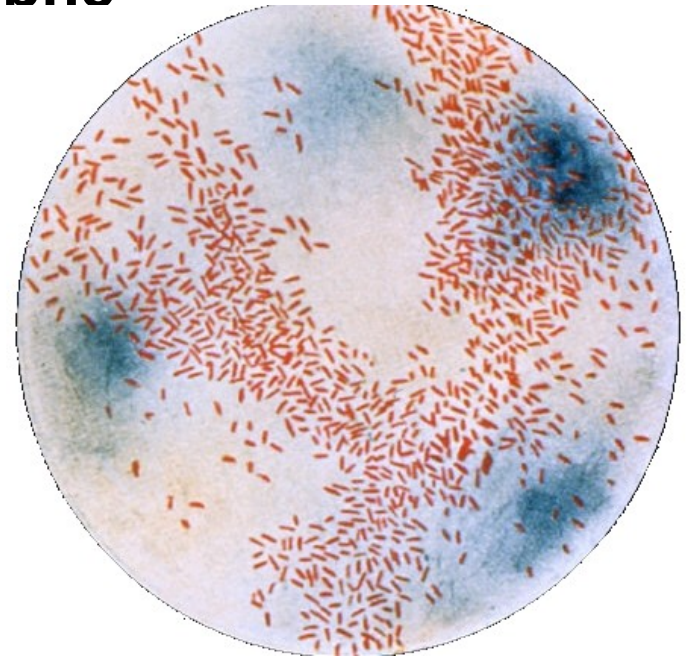
Obsah cvičení

- ▶ Čeleď *Pasteurellaceae*
 - Hemofily
 - *Pasteurella multocida*
 - Charakteristika, význam, léčba
 - Diagnostika
- ▶ G- nefermentující bakterie
 - Pseudomonády
 - Ostatní G- nefermentující bakterie
 - Charakteristika, význam, léčba
 - Diagnostika



Čeď *Pasteurellaceae* – rod *Haemophilus*

- ▶ Krátké G- tyčinky, pod mikroskopem – od malých kokobacilů po dlouhé tyčky.
- ▶ **Nerostou na Endu ani na KA → nedokáží získat z erytrocytů potřebné růstové faktory.** Na KA rostou pouze při společném růstu s jinými mikroorganismy (satelitový fenomén)
- ▶ Růst na čokoládovém agaru.



Klasifikace hemofilů

- ▶ ***Haemophilus influenzae***:
 - pouzderný typ b (Hib)
 - pouzderné typy a, c, d, e, f
 - neopouzdržené kmeny
- ▶ ***Haemophilus parainfluenzae*** (mnohem běžnější a mnohem méně patogenní).
- ▶ ***Haemophilus aphrophilus***
- ▶ ***Haemophilus ducreyi***, původce pohlavně přenášené choroby **ulcus molle**
- ▶ Velmi běžná je **přítomnost hemofilů v krku** → pochybná patogenní role (zvláště v případě *Haemophilus parainfluenzae* nepředpokládáme, že by byl patogenem).



Hemofily – klinický význam

Haemophilus influenzae

- ▶ Virulentní kmeny mají polysacharidové pouzdro (a až f), nejčastěji **typ b** (Hib).
- ▶ Nejzávažnější – invazivní infekce u předškolních dětí – **epiglottitida** (zánět hrtanové příklopky), **meningitida**, **pneumonie** a **sepse**.
- ▶ Dále **otitis media** a **sinusitida**.
- ▶ Od roku 2001 povinné **očkování** dětí.



Hemofily – klinický význam

Haemophilus ducreyi

- ▶ **Ulcus molle** – měkký vřed – pohlavní choroba vyskytující se především v subtropických a tropických oblastech.

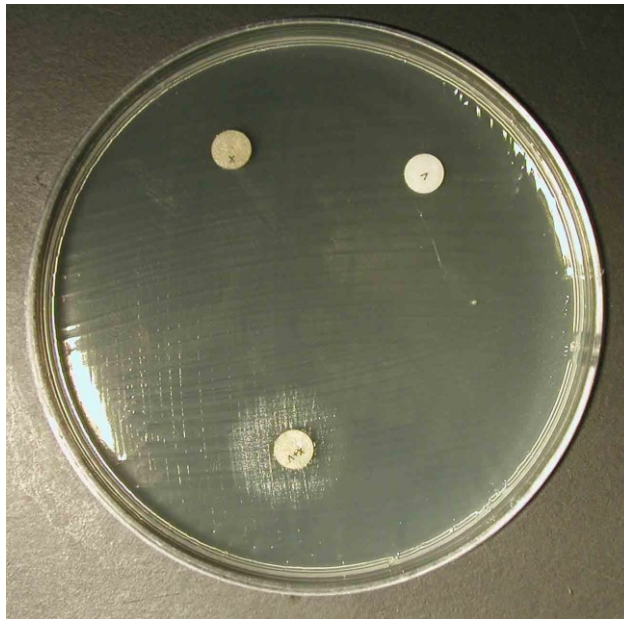


- ▶ **Pozor – ulcus durum – tvrdý vřed** – jeden z příznaků syfilis, způsobené *Treponema pallidum*



Hemofily – růstové faktory

- ▶ Hemofily vyžadují z erytrocytů určité růstové faktory, jejichž potřeba je druhově specifická:
 - *H. parainfluenzae* vyžaduje **faktor V** (= NAD)
 - *H. aphrophilus* vyžaduje **faktor X** (= hemin)
 - *H. influenzae* vyžaduje **oba faktory**.



Čeď *Pasteurellaceae* – rod *Pasteurella*

Pasteurella multocida

- ▶ Běžná součást **mikroflóry psích tlam**.
- ▶ Člověk – **zhnisání ran** způsobených pokousáním od psa.
- ▶ „Prý“ charakteristický pach (podobný hemofilovému, možné přirovnání k zápachu starého hadru).
- ▶ **Neroste na Endu, roste na KA** v koloniích podobajících se streptokokům a enterokokům.
- ▶ Rezistentní na vankomycin (pozor na VRE!) a citlivá na penicilin → indikátor.



G- nefermentující bakterie – charakteristika (GNFB)

▶ Obecně:

- striktní aerobové
- bakterie z vnějšího prostředí (saprofyté), často rostlinné patogeny
- nefermentují – 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

- ▶ Patří sem (mimojiné): ***Pseudomonas aeruginosa***, rody ***Acinetobacter***, ***Burkholderia*** nebo ***Stenotrophomonas***



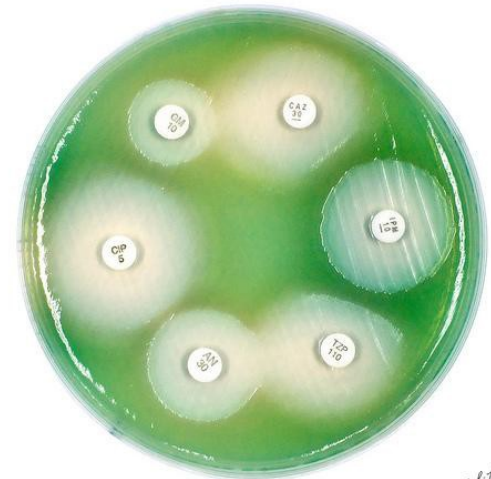
G- nefermentující bakterie: patogenita

- ▶ Bakterie z vnějšího prostředí – **zdravého člověka většinou nenapadají.**
- ▶ Cílem jsou **imunokompromitovaní pacienti** – s popáleninami, pacienti JIP, po transplantacích atd.
- U dlouhodobě hospitalizovaných nezpůsobují jen **infekce ran**, ale často je nacházíme i např. v **dýchacích cestách** či dokonce **v krevním řečišti. Záněty nehtového lůžka.**
- 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.



G- nefermentující bakterie – *Pseudomonas aeruginosa*

- ▶ G- rovná tyčinka.
- ▶ Charakteristický **zápach** (jasmín) a **barva** (zelený pigment, vzácně modrý).
- ▶ Vyskytuje se v odpadní vodě, střevě obratlovců, na rostlinách a v půdě.
- ▶ Významný původce **nozokomiálních nákaz**, kolonizuje vlhká místa pacienta (uši, podpaží,..).
- ▶ Významný původce infekcí **popálenin** těžkých operativních výkonů, kolonizace katétrů, napadají pacienty s malignitami **cystickou fibrózou** atd.



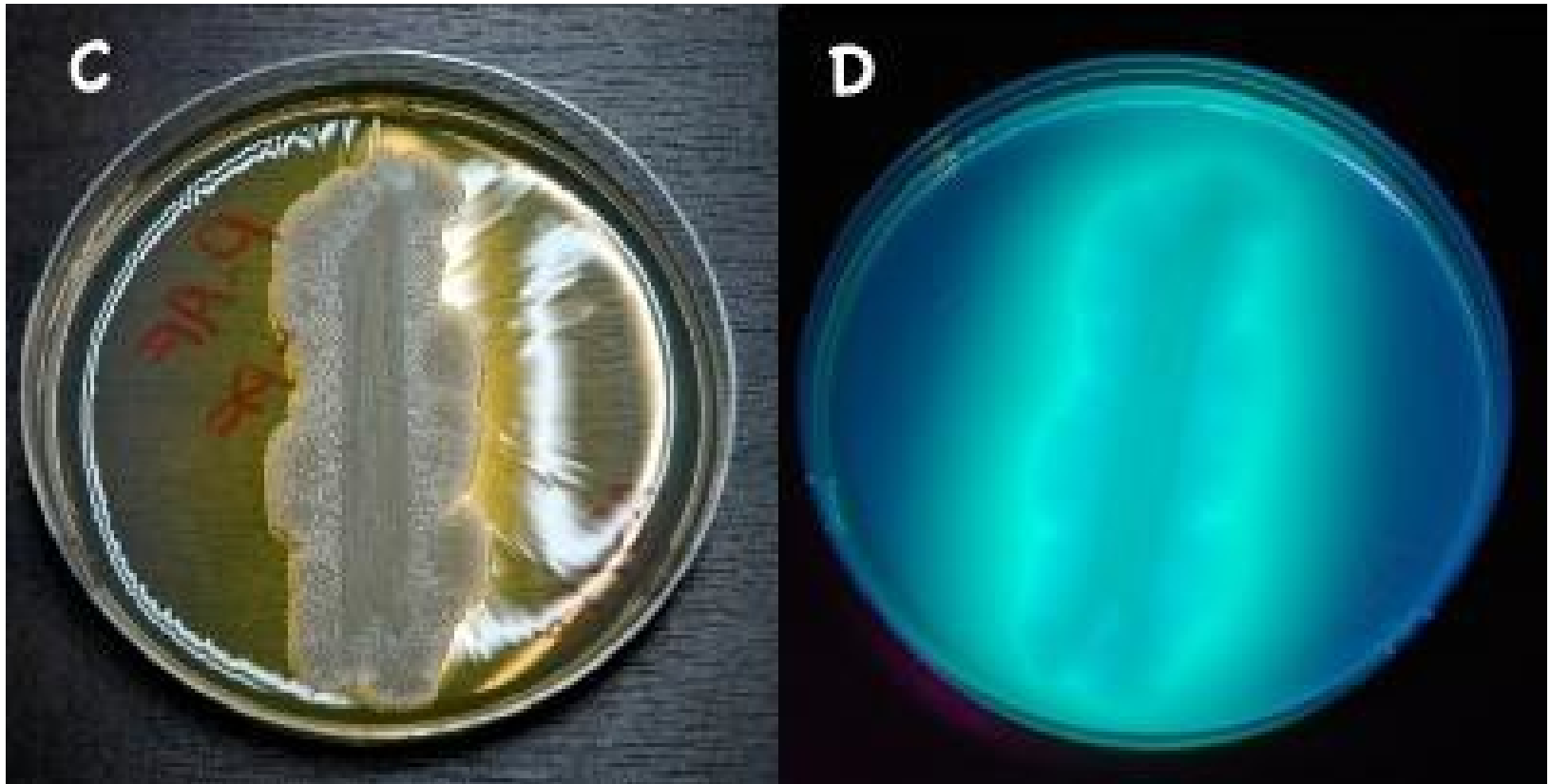
G- nefermentující bakterie a cystická fibróza

- ▶ 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*
 - *Staphylococcus aureus*
- ▶ Kmeny zpravidla získají **polyresistenci**.



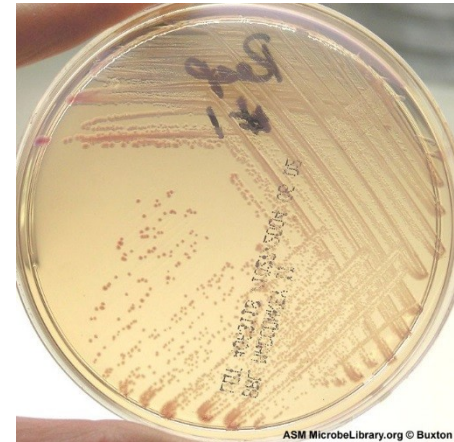
G- nefermentující bakterie: *Pseudomonas fluorescens*

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



G- nefermentující bakterie – rod *Burkholderia*

- ▶ *Burkholderia cepacia* způsobuje hnilobu cibule (*Allium cepa*), je to tedy typický **rostlinný patogen**.
Nozokomiální infekce dýchacích cest.



- ▶ *Burkholderia pseudomallei* je původcem těžkého onemocnění: **melioidózy**.
- ▶ *Burkholderia mallei* způsobuje zoonózu zvanou **malleus** (česky vozňřivka). Je nebezpečná i pro člověka.

G- nefermentující bakterie: *Stenotrophomonas maltophilia* a *Acinetobacter sp.*

- ▶ ***Stenotrophomonas maltophilia*** – respirační infekce, infekce ran, infekce močových cest.

Pozn. k názvu - *Stenotrophomonas maltophilia* – jméno dle úzkého spektra výživy, „maltózu-milující“.

- ▶ ***Acinetobacter sp.*** – nepohyblivý (z řečtiny – a-kineto).



Diagnostika hemofilů a pasteurel

▶ Kultivační půda:

- **Pasteurely** rostou na **KA** x **hemofily** nerostou na KA, ale na **čokoládovém agaru**.

▶ Růst hemofilů na KA:

- Hemofily rostou na KA pouze v přítomnosti takové bakterie, která jim krvinku „otevře“ (**satelitový fenomén**). Takovou bakterií je například zlatý stafylokok.

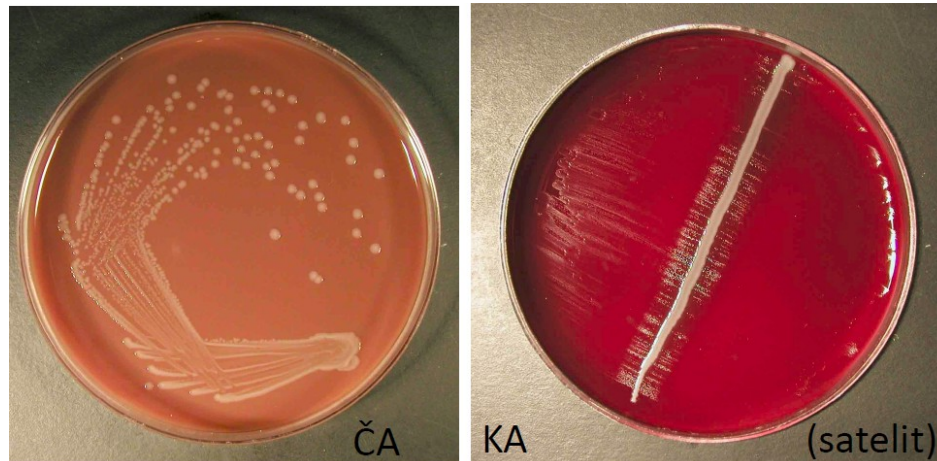
▶ Velikost kolonií:

- Velmi drobné kolonie → používá se disk napuštěný k bacitracinem k odclonění ostatních bakterií (ve vyšší koncentraci než v bacitracinovém testu).



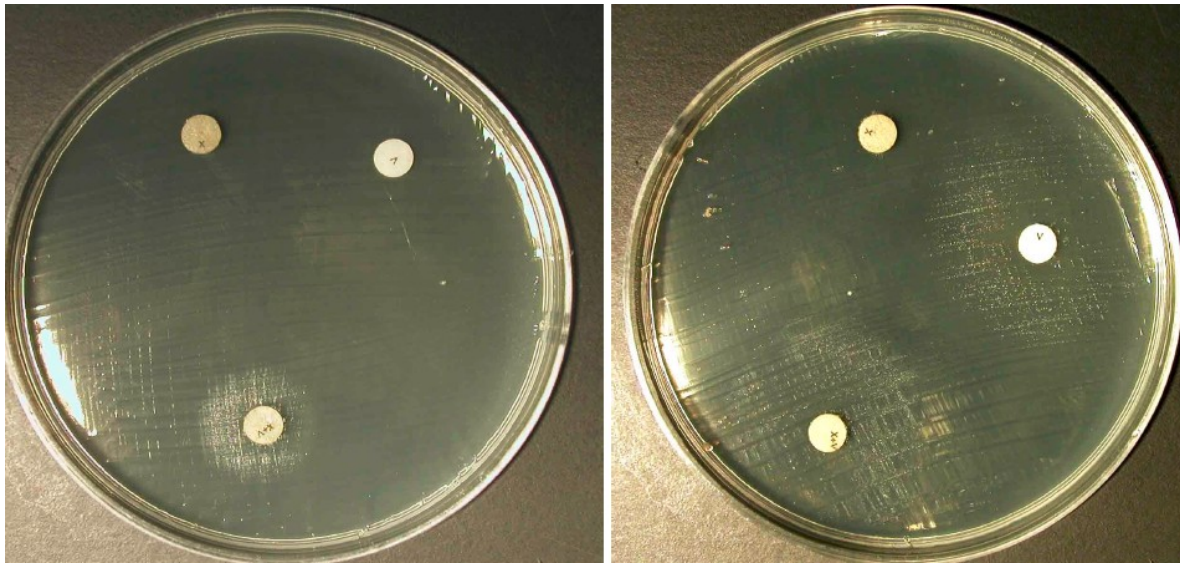
Diagnostika hemofilů – satelitový fenomén

- ▶ Hemofily potřebují pro získání růstových faktorů z erytrocytů tyto erytrocyty rozrušit. To je možné:
 - Zahřátím agaru = čokoládový agar
 - Přítomností jiného mikroba = satelitový fenomén – vyočkování hemofilů přes celou misku a vprostřed misky naočkovaný pruh *Staphylococcus aureus* → rozruší erytrocyty a umožní tak růst hemofilů na KA.



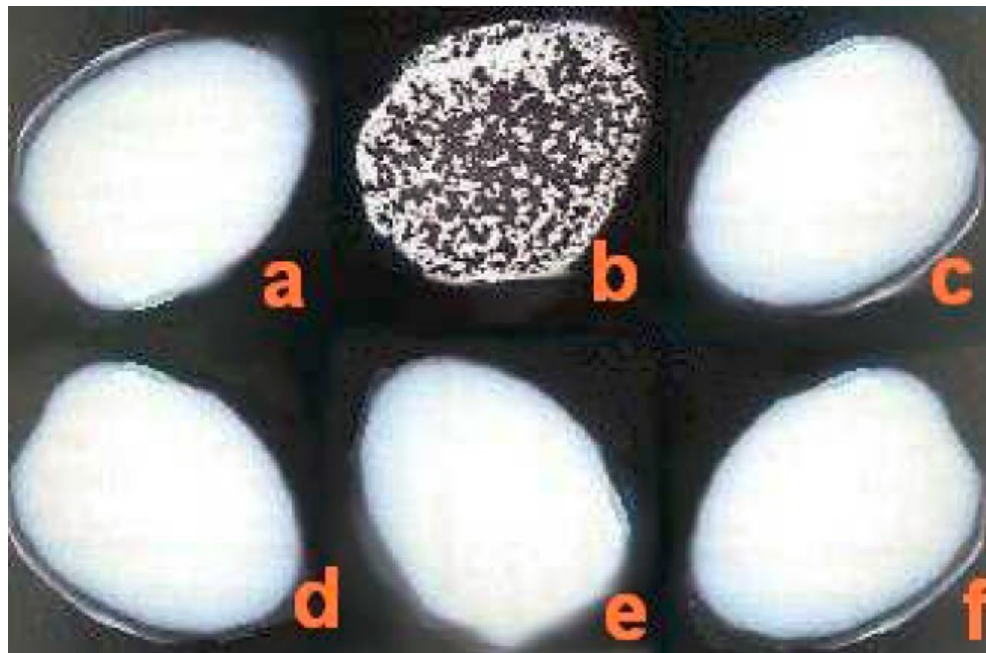
Diagnostika hemofilů – růstové faktory

- ▶ Růstové faktory hemofilů:
 - *H. parainfluenzae* vyžaduje faktor **V** (= NAD)
 - *H. aphrophilus* vyžaduje faktor **X** (= hemin)
 - *H. influenzae* vyžaduje **oba faktory**.



Diagnostika hemofilů a pasteurel – antigenní analýza

- ▶ Komerční soupravy, včetně latexových částic.
- ▶ Koaglutinace = reakce se stafylokokem → aglutinát byl hustší díky navázání stafylokoka na Fc konec protilátky proti hemofilovi.



koláž s použitím:
www.microbes-edu.org

Diagnostika pasteurel – vzorce citlivosti na ATB

- ▶ **G- nejsou citlivé na vankomycin** (ten však působí na všechny streptokoky, většinu stafylokoků a enterokoků).
 - ▶ Málo G- je také citlivých na penicilin.
- **citlivost na penicilin a rezistence k vankomycinu → rod *Pasteurella*.**
-
- ▶ **Pozn. k hemofilům:** Hemofily se na ATB citlivost testují na Levinthalově agaru (přefiltrovaný čokoládový agar).
-



Diagnostika GNFB

- ▶ **Mikroskopie** – až na rod *Acinetobacter* jde o G- tyčinky.
- ▶ **Kultivace** – růst na většině půd, nefermentují glukózu a většinou ani laktózu.
- ▶ **Biochemie** – lze použít, ale pouze u testů zjišťujících aerobní respiraci. Nutná kultivace testu při snížené teplotě a prodloužené době.
- ▶ **Antigenní analýza, detekce DNA** – rutinně se nepoužívá.



Diferenciální diagnostika GNFB (1)

- ▶ **Gramovo barvení:** G- tyčinky × jiné bakterie
- ▶ **Endova půda:** rostou
- ▶ Nefermentující se odliší od enterobakterií/vibrií tím, že nefermentují glukózu. → **na Hajnově půdě nedochází k žádné změně barvy = zůstává celá červená** (může být lehce nahnědlá – pigmenty).



Diferenciální diagnostika GNFB (2)

▶ Pseudomonády:

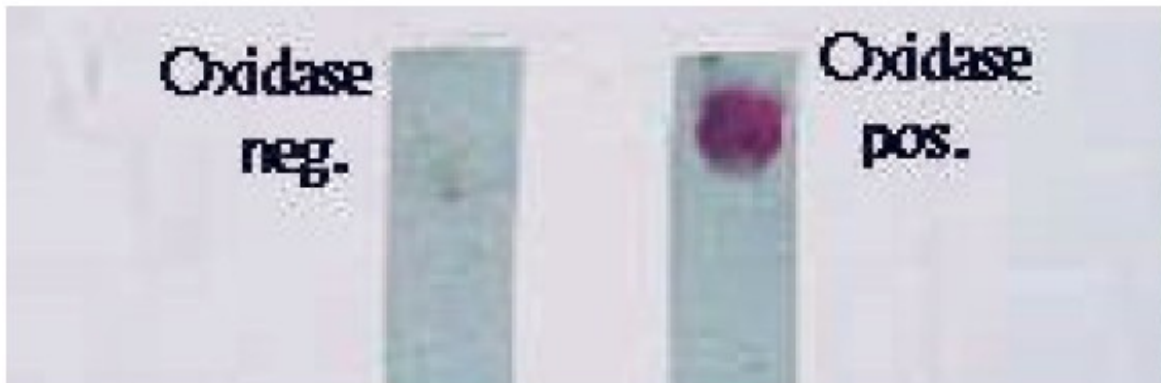
- Mladé kultury mají typickou vůni
 - Tvoří pigmenty (hlavně zelené – pigment pyoverdin, vzácně modré, narezavělé)
 - Kolonie jsou nejlépe viditelné na MH, ale rostou i na KA, Endo (zde mají perleťový lesk)
 - Oxidáza pozitivní
- ▶ Ostatní nefermentující, případně sporné pseudomonády
→ biochemie → **NEFERMtest 24** (v kombinaci s oxidázovým testem).



Diferenciální diagnostika GNFB (3)

▶ Oxidáza:

- Pozitivní: *Pseudomonas*, *Burkholderia*
- Negativní: *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*

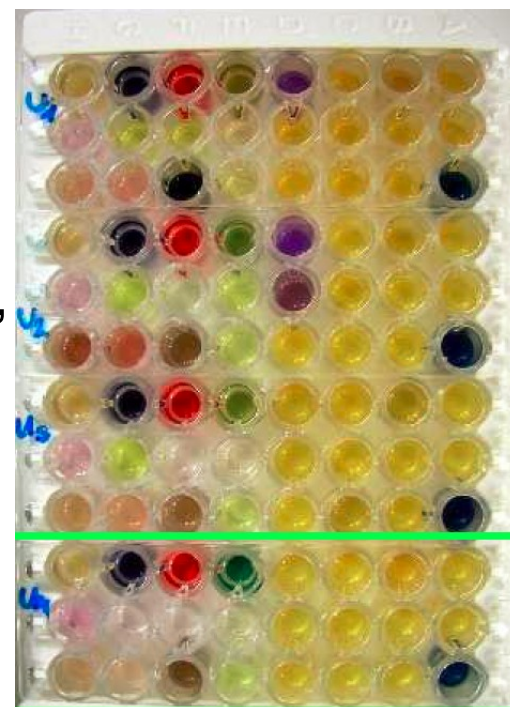


medic.med.uth.tmc.edu/path/oxidase.htm



NEFERMtest 24

- ▶ Trojstrip (minulý týden byl dvojstrip)
- ▶ **Tvorba kódu:**
 - První číslice je 0 (oxidáza negativní) nebo 1 (oxidáza pozitivní).
 - Dalších 6 číslic pochází ze sloupců H až C.
 - Sloupce A a B se nepočítají (používají se jen pro případné další rozlišení).
 - Jedna destička – 4 kmény po třech řádcích, pro každý kmen 24 reakcí.



ATB citlivost GNFB

- ▶ GNFB rostou na většině médií.
- ▶ Pro léčbu i testování se používají silná ATB nevhodná k použití u běžných bakterií →
 - cefalosporiny 3. generace, často v kombinaci s inhibitory betalaktamáz.
 - pseudomonádové cefalosporiny: protipseudomonádové peniciliny, monobaktamy a karbapenemy (imipenem, piperacilin/tazobactam)
 - aminoglykosidy (gentamicin, amikacin)
 - fluorochinolony (ciprofloxacin, ofloxacin)
 - polypeptidy (kolistin)



Úkol č. 1 – Gramovo barvení

- ▶ Obarvěte podle Grama 12 podezřelých kmenů (pro zopakování: natřít → nechat uschnout → fixovat plamenem → poté barvit: Gram 30 s → Lugol 20-30 s → **opláchnout vodou** → alkohol 15-20 s → opláchnout vodou → safranin 60 → opláchnout vodou → **osušit filtračním papírem (nedrhnout buničinou ani ničím jiným!)** → imerzní objektiv - olej)
- ▶ Odlišíte G+ bakterie od G- tyčinek/koků.



Úkol č. 2 – Kultivace na agarových půdách

- ▶ Popište nárůst kolonií na KA, ty které zde nerostou popište na čoko agaru.
- ▶ Popište růst na Endově půdě – rostou x nerostou. Neuposuzujte fermentaci laktózy – nemáme izolované kolonie.
- ▶ U jednoho kmene rostoucího na MH agaru si povšimněte tvorby pigmentů (pokud nějaké jsou). Tuto misku využijte i pro úkol 6b.
- ▶ **Růst na KA:** nerostou na něm hemofily



Úkol č. 3 – Identifikace *Pasteurellaceae* a jejich přesnější určení (1)

- ▶ **3a) Satelitový fenomén** – růst hemofilů na KA kolem linie naočkovaného stafylokoka → satelit. Zakreslete, popište.
- ▶ **3b) Identifikace hemofilů podle potřeby růstových faktorů:**
 - *H. parainfluenzae* vyžaduje **faktor V** (= NAD)
 - *H. aphrophilus* vyžaduje **faktor X** (= hemin)
 - *H. influenzae* vyžaduje **oba faktory**.



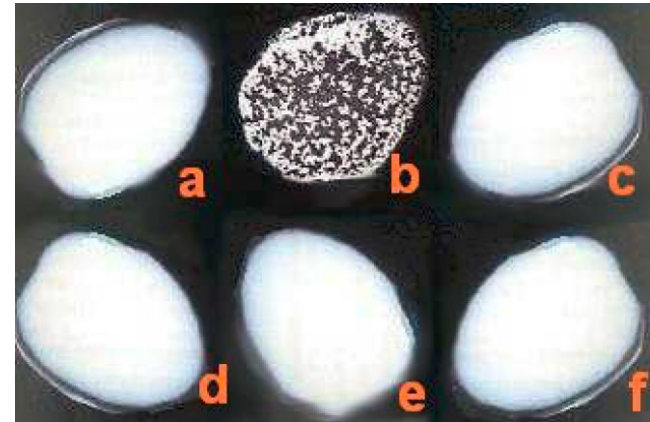
Úkol č. 3 – Identifikace *Pasteurellaceae* a jejich přesnější určení (2)

- ▶ **3c) Detekce kapsulárních antigenů *H. Influenza*:**
Koaglutinace = reakce se stafylokokem → aglutinát byl hustší díky navázání stafylokoka na Fc konec protilátky proti hemofilovi.

- ▶ **3d) Detekce *P. multocida* pomocí typického vzorce citlivosti:**

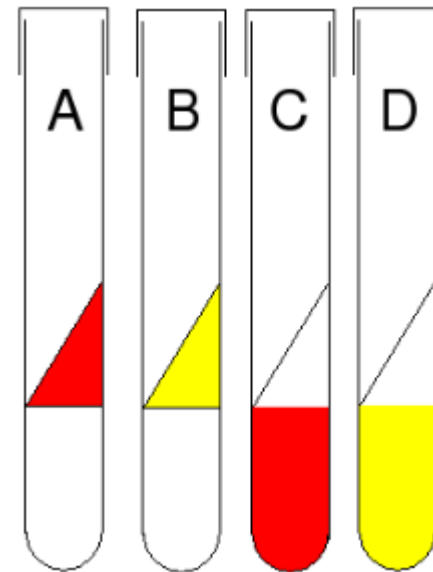
citlivost na penicilin a

rezistence k vankomycinu → rod *Pasteurella*.



Úkol č. 4 – Hajnova půda

- ▶ Zapište si, které kmeny fermentují glukózu a které ne.
 - štěpení laktózy (A = negativní, B = pozitivní)
 - štěpení glukózy (C = negativní, D = pozitivní)
 - produkce H_2S (pozitivní = zčernání půdy)
 - tvorba plynu (pozitivní = potrhaná půda bublinky, půda vysunutá nahoru)



Úkol č. 5 – Určení G– glukózu nefermentujících bakterií a G– koků (1)

▶ 5a) Oxidázový test:

- **GNFB:** *Pseudomonas* je vždy pozitivní, *Burkholderia* většinou pozitivní, *Stenotrophomonas* bývá zpravidla negativní. Oxidáza pozitivní bakterie s typickou vůní a pigmentem (zpravidla zeleným, řidčeji modrým či zrzavým) je prakticky s jistotou *Pseudomonas aeruginosa* (není nutno provádět biochemii 5a)



Úkol č. 5 – Určení G– glukózu nefermentujících bakterií a G– koků (2)

▶ 5b) Podrobné biochemické testování:

NEFERMtest 24:

▶ Tvorba kódu:

- První číslice je 0 (oxidáza negativní) nebo 1 (oxidáza pozitivní).
- Dalších 6 číslic pochází ze sloupců H až C.
- Sloupce A a B se nepočítají (používají se jen pro případné další rozlišení).
- Jedna destička – 4 kmeny po třech řádcích, pro každý kmen 24 reakcí.



Úkol č. 6 – Testy citlivosti patogenů na antibiotika

- ▶ **6a, b, c):** Odečtete difúzní diskový test pro kmen určený jako *Haemophilus influenzae*, pasterela a pseudomonáda.
- ▶ **6d):** Kontrola primárních rezistencí u kmenů burkholderie a stenotrofomonády – pouze na bočním stole.



Úkol č. 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 znát:

- ▶ G- tyčinky čeledi Pasteurellaceae – **hemofily**, pasterely: význam, diagnostika, léčba
- ▶ GNFB – **pseudomonády**, rody *Acinetobacter*, *Burkholderia* a *Stenotrophomonas*: význam, diagnostika, léčba

