

Téma P05: Diagnostika *Pasteurellaceae* a G– nefermentujících tyčinek

Ke studiu: *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas* a G– nefermentující tyčinky (učebnice, WWW atd.)

Z jarního semestru: Mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace, antigenní analýza

Tabulka pro hlavní výsledky úkolů 1 až 5 (k postupnému vyplnění):

Kmen		K	L	M	N	P	Q	R	S
Gramovo barvení – Úkol 1									
Úkol 2 Kul- tiva- ce	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)									
Úkol 3c Pouzderňý typ: <i>Haemophilus</i>									
3d Test citlivosti	Penicil.								
	Vanko.								
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)

[#]Neroste/roste a nefermentuje laktózu/roste a fermentuje laktózu

Úkol 1: Mikroskopie suspektních kmenů

Na stole máte kmeny popsané písmeny. Obarvíte je podle Grama, a do tabulky vepíšete výsledky. Kmen, který není G– tyčinka, nebude studován v úkolech 3 až 5 (ale v Úkolu 2 si ho pro srovnání popíšete)

Úkol 2: Kultivace na agarových půdách

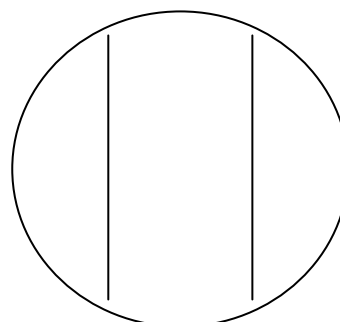
Nejdříve napište, které bakterie rostou na krevním agaru a které ne. Pak, používající standardních procedur, popíšete kolonie všech kmenů na krevním agaru. Pouze ty, které na KA nerostou, popíšete na čokoládovém agaru. Poté popíšete růst na Endově půdě (stačí „-“ pokud nerostou a „+“ pokud rostou; fermentaci laktózy nelze posuzovat, neboť kmeny jsou naočkovány na osminy a netvoří izolované kolonie). Na MH agaru hodnotíte pouze jeden z kmenů, a to pouze z hlediska případného pigmentu (miska slouží i pro úkol 6b – testování citlivosti).

*demonstrační misku s naočkovánými, avšak nevyrostlými kmeny, naleznete na bočním stole

Úkol 3: Identifikace *Pasteurellaceae* 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

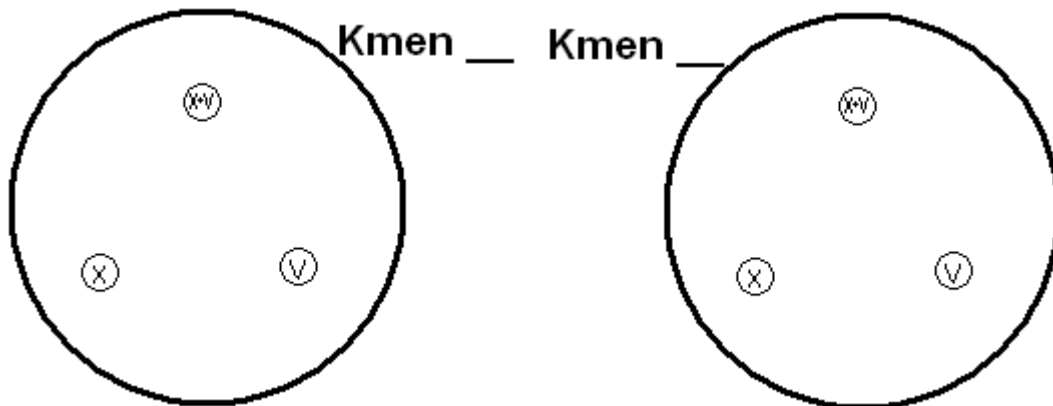


Staphylococcus aureus

Kolonie hemofilů

b) Identifikace hemofilů podle potřeby růstových faktorů

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



c) Detekce kapsulárních antigenů *H. influenzae*

Popište výsledek aglutinace kapsulárních antigenů *H. influenzae* pomocí latexové aglutinace (z prezentace).

d) Detekce *P. multocida* pomocí typického vzorce citlivosti

Velmi typická pro *P. multocida* je její citlivost k penicilinu, velmi vzácná u G- tyčinek. Na druhou stranu je rezistentní k mnohem silnějšímu (ovšem pouze pro G+ bakterie vhodnému) antibiotiku vankomycinu. Zapište.

Úkol 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 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, kde je to jen jeden den) 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 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 6: Testy citlivosti patogenů na antibiotika

Mezi vašimi bakteriemi je pět patogenních: dvě z čeledi *Pasteurellaceae* a tři G– nefermentující. Z nich však budete měřit velikosti zón jen pro pseudomonádu. Zapište celé názvy antibiotik a změřte velikost zón. Zapište kmeny jako citlivé (C) rezistentní (R) a intermediární (I).

6a) Test pro hemofila (jako *Haemophilus influenzae* byl určen kmen ___)

Antibiotikum (celé jméno)	Ø zóny (mm)	Interpr.
Penicilin (P) C ≥ 12 / R < 12		
Ko-amoxicilin (AMC) C ≥ 15 / R < 15		
Cefuroxim (CXM) C ≥ 26 / R < 26		
Kys. nalidixová (NA) C ≥ 23 / R < 23		
Tetracyklin (TE)* C ≥ 25 / R < 22		
Ko-trimoxazol (SXT) C ≥ 23 / R < 20		

*platí i pro doxycyklin

6b) Test pro pasteurellu (jako *Pasteurella multocida* byl určen kmen ___)

Antibiotikum (celé jméno)	Ø zóny (mm)	Interpr.
Ko-amoxicilin (AMC) C ≥ 15 / R < 15		
Cefotaxim (CTX) C ≥ 26 / R < 26		
Ciprofloxacin (CIP) C ≥ 27 / R < 27		
Tetracyclin (TE)* C ≥ 24 / R < 24		
Ko-trimoxazol (SXT) C ≥ 23 / R < 23		
Penicilin (P) C ≥ 17 / R < 17		

6c) Test pro pseudomonádu (jako pseudomonáda byl určen kmen ___)

Antibiotikum	Ø zóny (mm)	Interpr.	Antibiotikum	Ø zóny (mm)	Interpr.
Piperacilin+tazobaktam (TZP) C ≥ 18 / R < 18			ciprofloxacin (CIP) C ≥ 26 / R < 26		
gentamicin (CN) C ≥ 15 / R < 15			ceftazidim (CAZ) C ≥ 17 / R < 17		
ofloxacin (OFL) C ≥ 16 / R < 13			kolistin (CT) C ≥ 11 / R < 11		

Poznámka: Tazobaktam působí jako inhibitor betalaktamázy, zároveň ale má i svoji vlastní antimikrobiální účinnost.

6d) Kontrola primárních rezistencí u kmenů burkholderie a stenotrofomonády

TABLE 2. Intrinsic resistance in non-fermentative Gram-negative bacteria; non-fermentative Gram-negative bacteria are also intrinsically resistant to benzylpenicillin, ceftoxitin, cefamandole, cefuroxime, glycopeptides, fusidic acid, macrolides, lincosamides, streptogramins, rifampicin, daptomycin, and linezolid

Rule no.	Organisms	Ampicillin	Ampicillin-clavulanate	Ticarcillin	Ticarcillin-clavulanate	Piperacillin	Piperacillin-tazobactam	Ceftazidime	Ceftazidime	Ceftazidime	Ceftazidime	Ertapenem	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacin	Chloramphenicol	Aminoglycosides	Trimethoprim	Trimethoprim-sulphamethoxazole	Fosfomycin	Tetracycline/tigecycline	Polymyxin B/colistin
2.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R ^a	R ^a	-	-	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	R	-	R	-	-	-
2.2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	R	-	-	-	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.3	<i>Burkholderia cepacia</i> complex ^b	R	R	R	R	-	-	R	R	R	-	R	R	-	R	R	R ^c	R	-	R	-	-
2.4	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	R	-	R	R	-	-	R	R	R	-	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	R
2.5	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	R	R	R	R	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	-	-	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	R	Not ^d	R ^e	R ^e	-	R	-
2.7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	R	-	R	-	R	R	R	-	R	-	R	-	-	R ^c	R ^f	R	-	-	-

R, resistant.

^a*Acinetobacter baumannii* may appear to be susceptible to ampicillin-sulbactam, owing to the activity of sulbactam against this species.

^b*Burkholderia cepacia* complex includes different species. Some strains may appear to be susceptible to some β -lactams *in vitro*, but they are clinically resistant and are shown as R in the table.

^c*Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia* are intrinsically resistant to all aminoglycosides. Intrinsic resistance is attributed to poor permeability and putative efflux. In addition, most *Stenotrophomonas maltophilia* isolates produce the AAC(6)-Ib enzyme.

^d*Pseudomonas aeruginosa* is intrinsically resistant to kanamycin and neomycin, owing to low-level APH(3)-IIb activity.

^e*Pseudomonas aeruginosa* is typically resistant to trimethoprim and moderately susceptible to sulfonamides. Although it may appear to be susceptible *in vitro* to trimethoprim-sulphamethoxazole, it should be considered to be resistant.

^f*Stenotrophomonas maltophilia* may show low ceftazidime MIC values but should be considered to be resistant.

^g*Stenotrophomonas maltophilia* is typically susceptible to trimethoprim-sulphamethoxazole but resistant to trimethoprim alone.

©2011 The Authors
Clinical Microbiology and Infection ©2011 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 19, 141-160

Ve výše uvedené tabulce přirozených rezistencí, vydané organizací EUCAST, vidíte přirozené rezistence u nejběžnějších gramnegativních nefermentujících bakterií. Na bočním stole vidíte testy citlivosti u burkholderie a stenotrofomonády. Abyste nemuseli měřit zóny, jsou zde již zaznačeny referenční zóny, takže jen porovnejte, zda reálná zóna je či není větší než referenční zóna zakreslená fixou. Do textu na další stránce запиšte dle tabulky EUCAST antibiotika, na která je daný druh bakterie primárně rezistentní – **vyberte je ale pouze z těch šesti, na která byly naše kmeny testovány**. Dále запиšte, zda testované kmeny na bočním stole jeví všechny přirozené rezistence, které mají vykazovat (v tom případě „souhlasí“ a není třeba více vypisovat), nebo některou z nich nevykazují; v takovém případě napište antibiotikum nebo antibiotika, která nesouhlasí.

Zapište:

Kmen ____ (<i>S. maltophilia</i>) by měl být primárně rezistentní na tato antibiotika: _____ _____
Citlivost zjištěná difusním diskovým testem s tímto <input type="checkbox"/> souhlasí <input type="checkbox"/> nesouhlasí v případě tohoto antibiotika či těchto antibiotik: _____
Kmen je citlivý na antibiotika: _____
Kmen ____ (<i>B. cepacia</i>) by měl být primárně rezistentní na tato antibiotika: _____ _____
Citlivost zjištěná difusním diskovým testem s tímto <input type="checkbox"/> souhlasí <input type="checkbox"/> nesouhlasí v případě tohoto antibiotika či těchto antibiotik: _____
Kmen je citlivý na antibiotika: _____

Poznámka: V praxi, pokud citlivost nesouhlasí (kmen vyjde jako citlivý ačkoli by měl být primárně rezistentní), považuje se i tak za rezistentní. Pokud je však diskrepancí více, je zpravidla vhodné ověřit citlivost kvantitativními testy, případně zkontrolovat, zda bylo správně provedeno rodové a druhové určení kmene.

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

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

Kmen			
Růst v bujónu			
Růst ve VL bujónu			
Závěr			