**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 charakteri-stiky na KA (ČA\*) | |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Endova p.  (–/L-/L+#) | |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MH agar (barva) | |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Úkol 3a Satelitový fenomén (+/–) | | |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Úkol 3b Růstové f. (X, V, X + V) | | |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Úkol 3c Aglutinace km. *H. influenzae* | | |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 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. 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 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 *(demonstrační misku s naočkovanými, avšak nevyrostlými kmeny, naleznete na bočním stole)*, popište na čokoládovém agaru.

Poté popište růst na Endově půdě: „–“ pokud nerostou, „L–“ pokud rostou, ale nefermentují laktózu „L+“ pokud laktózu fermentují. Dejte pozor: některé kmeny mohou předstírat pozitivitu laktózového testu, ačkoli jsou laktóza negativní: produkují pigmenty, takže kolonie jsou tmavé, avšak okolí je světlé. V případě pochyb porovnejte s Hajnovou půdou (Úkol 4): úplná žlutá barva = fermentuje glukózu i laktózu, úplná červená barva = nefermentuje glukózu ani laktózu, napůl červená a napůl žlutá = fermentuje glukózu, ale ne laktózu.

Co se týče MH agaru: prověřte pouze jeden kmen, a to pouze na případnou přítomnost pigmentu. Použijte misku z Úkolu 1 nebo z Úkolu 6b (není žádná speciální miska s MH agarem pro Úkol 2).

## 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 (testován u dvou kmenů) a spojte popisky s příslušnými jevy na obrázku. Výsledek zapište do hlavní tabulky na první straně.

Kolonie hemofilů

*Staphylococcus aureus*

## b) Identifikace hemofilů podle potřeby růstových faktorů

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

## Hemofil praktika C

## 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.

## e) Potvrzení určení *Pasteurella multocida* pomocí MALDI-TOF

Podívejte se na výsledky MALDI-TOF u našeho kmene pasteurely. Rozhodněte:

Určení *Pasteurella multocida* z předchozích testů **je – není** (nehodící se škrtněte) potvrzeno MALDI-TOF.

## Úkol 4: Hajnova půda (Triple Sugar Iron Agar v modifikaci dle A. A . Hajny)

Prohlédněte si kultivační výsledky čtyř kmenů na Hajnově půdě. Kmen, který fermentuje glukózu (žlutá barva) označte jako „+“, kmeny nefermentující (červená) jako „–“. Ostatní výsledky (laktóza, sirovodík) nejsou v tomto praktiku důležité, ale výsledek fermentace laktózy (úplná žlutá vs. červenožlutá barva) můžete případně použít pro porovnání s Úkolem 2.

## 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) resistentní (R) a intermediární (I).

## 6a) Test pro hemofila (jako *Haemophilus influenzae* byl určen kmen \_\_\_)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Antibiotikum  (celé jméno) |  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)  \*platí i pro doxycyklin  C ≥ 23 / R < 20 |  |  |

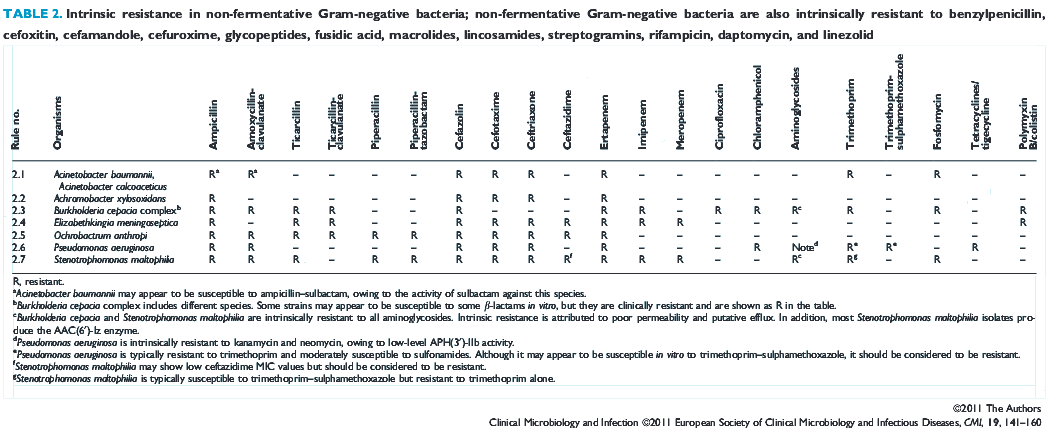
## 6b) Test pro pasteurellu (jako *Pasteurella multocida* byl určen kmen \_\_\_)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Antibiotikum  (celé jméno) |  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 |  zóny (mm) | Interpr. | Antibiotikum |  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



Ve výše uvedené tabulce přirozených rezistencí, vydané organizací EUCAST#, vidíte přirozené rezistence u nejběžnějších gramnegativních nefermentujících bakterií. Na bočním stole vidíte testy citlivosti u burhkolderie a stenotrofomonády. Není třeba měřit zóny, jsou již změřeny.

# EUCAST = The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**Na víčku Petriho misky můžete najít:**

**1. sloupec:** přirozené rezistence daného kmene (opsané z tabulky EUCAST nahoře): „R“ = kmen je přirozeně rezistentní, „–“ = kmen není přirozeně rezistentní. **Jsou zde zapsány pouze přirozené rezistence na antibiotika z naší sestavy (PS1)**. *Poznámka: Tabulka nahoře neobsahuje ofloxacin (OFX), ale kmeny primárně rezistentní k ciprofloxacinu můžeme považovat za rezistentní i k ofloxacinu. Tabulka také jmenovitě neobsahuje gentamicin (CN), ale výsledek může být odvozen od „Aminoglykosidů“.*

**2. sloupec:** výsledky měření zón a jejich porovnání s referenční zónou: S = citlivý (susceptible), R = rezistentní

Zapište na následující stranu, jaké jsou podle EUCAST přirozené rezistence *B. cepacia* a *S. maltophilia* (opište z prvního sloupce).

Poté zkontrolujte, zda jsou všechny přirozené rezistence vyjádřeny podle následující tabulky:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Přirozená rezistence (R)? | Změřeno jako | Závěr |
| – | citlivé (S) | výsledek je v souladu, kmen lze dát do výsledku jako „citlivý“ |
| R | rezistentní (R) | výsledek je v souladu, kmen musí figurovat ve výsledku jako „rezistentní“ |
| – | rezistentní (R) | výsledek je v souladu, kmen musí figurovat ve výsledku jako „rezistentní“  (jde o sekundární rezistenci) |
| R | citlivé (S) | **výsledek není v souladu, kmen je třeba dát do výsledku jako „rezistentní“, můžeme hovořit o „falešné citlivosti“** |

Nakonec ještě zapište, zda je kmen citlivý na některá antibiotika (zapište kmen jako citlivý jen na ta antibiotika, u kterých může tento výsledek být uveden ve výsledku, tj. nikoli u těch, které byly změřeny jako citlivé, ale je nutno je kvůli přirozené rezistenci považovat za rezistentní).

Zapište:

|  |
| --- |
| Kmen \_\_\_ (*S. maltophilia*) je podle EUCAST primárně rezistentní na tato antibiotika: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_.  Citlivost zjištěná difusním diskovým testem s tímto   * souhlasí (= není tu žádná „falešná citlivost“) * nesouhlasí v případě tohoto antibiotika či těchto antibiotik: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_   Kmen je citlivý na antibiotika: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ |
| Kmen \_\_\_ (*B. cepacia*) je podle EUCAST primárně rezistentní na tato antibiotika: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_.  Citlivost zjištěná difusním diskovým testem s tímto   * souhlasí (= není tu žádná „falešná citlivost“) * nesouhlasí v případě tohoto antibiotika či těchto antibiotik: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_   Kmen je citlivý na antibiotika: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ |

*Poznámka: 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 parafinu na povrchu), vyhodnoťte růst bakterií a jeho charakter.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Kmen |  |  |  |
| Růst v bujónu |  |  |  |
| Růst ve VL bujónu |  |  |  |
| Závěr |  |  |  |