

**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+ <sup>#</sup> )								
	MH agar (barva)								
Úkol 3a Satelitový fenomén (+/-)									
Úkol 3b Růstové f. (X, V, X + V)									
Úkol 3c Aglutinace km. <i>H. influenzae</i>									
3d Test citlivosti	Penicil.								
	Vanko.								
Fermentace gluk. Úkol 4 (Hajna)									
Oxidázový test Úkol 5a									
NEFERMtest 24 Úkol 5b									
<b>KONEČNÝ ZÁVĚR</b>									

\*Pro bakterie nerostoucí na krevním agaru (KA) použijte čokoládový agar (ČA)

<sup>#</sup>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, používající 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.

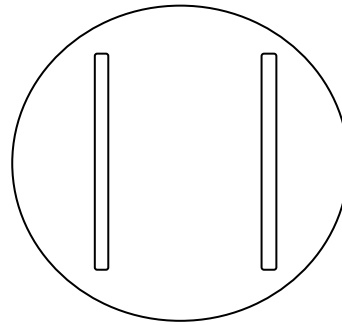
Poté popište růst na Endově půdě: „-“ pokud nerostou, „L-“ pokud rostou, ale nefermentují laktózu „L+“ pokud laktózu fermentují. Dejte pozor: některé kmeny mohou předstírat pozitivitu laktózoového testu, ačkoli jsou laktóza negativní: produkují pigmenty, takže kolonie jsou tmavé, avšak okolí je světlé. 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.

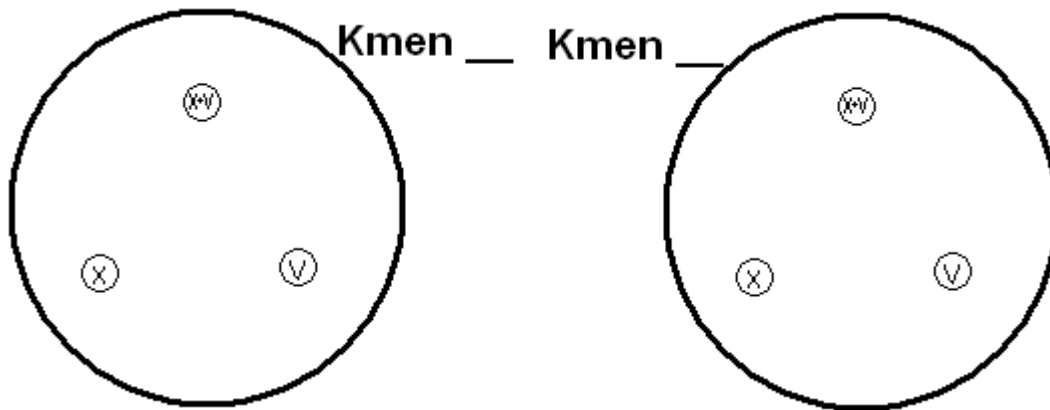


*Staphylococcus aureus*

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<sup>-</sup> tyčinek. Na druhou stranu je rezistentní k mnohem silnějším (ovšem pouze pro G<sup>+</sup> 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 kulturační 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<sup>-</sup> glukózu nefermentujících bakterií

#### a) Oxidázový test

Demonstrace oxidázového testu u tří kmenů určených jako G<sup>-</sup> 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		
Ciprofloxacín (CIP) C ≥ 27 / R < 27		
Tetracyklin (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			ciprofloxacín (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		
<i>Poznámka: Tazobaktam působí jako inhibitor betalaktamázy, zároveň ale má i svoji vlastní antimikrobiální účinnost.</i>					

**6d) Kontrola primárních rezistencí u kmenů burkholderie a stenotrofomonády**

Studenti zubního lékařství tuto část neprovádějí.

**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			