

**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. 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 (*demonstrační misku s naočkovanými, avšak nevyrostlými kmeny, naleznete na bočním stole*), popíšete na čokoládovém agaru.

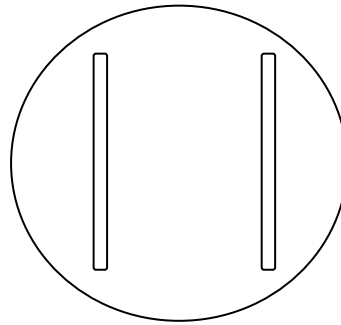
Poté popíšete růst na Endově půdě: „-“ pokud nerostou, „L-“ pokud rostou, ale nefermentují laktózu „L+“ pokud laktózu fermentují. Dejte pozor: některé kmeny mohou předstírat pozitivitu laktózoového testu, ačkoli jsou laktóza negativní: produkují pigmenty, takže kolonie jsou tmavé, avšak okolí je světlé.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

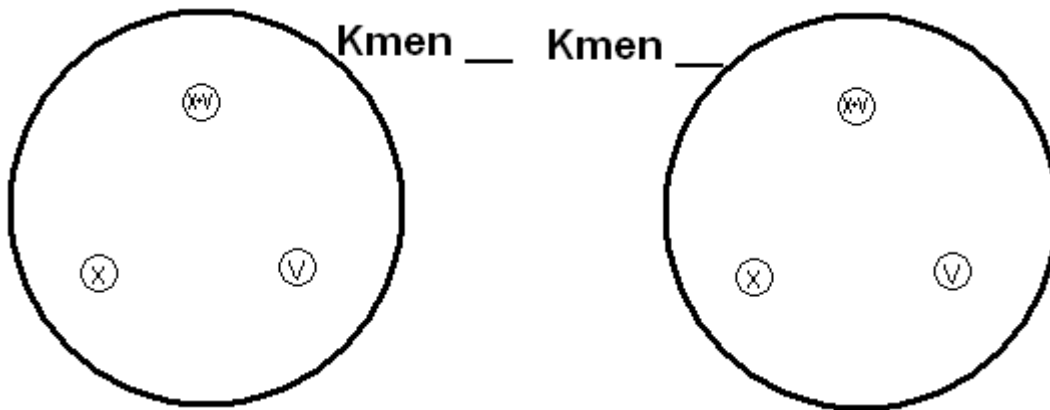


*Staphylococcus aureus*

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 silnějšímu (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 – TSI 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 nevyočítávají. 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		

*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-sulbactam	Ticarcillin	Ticarcillin-clavulanic acid	Piperacillin	Piperacillin-tazobactam	Ceftazidim	Ceftazidime	Ceftazidime-avopivoxil	Ceftazidime	Ertapenem	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacín	Chloramphenicol	Aminoglycosides	Trimethoprim	Trimethoprim-sulphamethoxazole	Fosfomycin	Tetracyclines/tigecycline	Polymyxin B/colistin
2.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R*	R*	-	-	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	R	-	R	-	-
2.2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	R	-	-	-	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	R	-	R	-	-
2.3	<i>Acinetobacter xylosoxidans</i>	R	-	-	-	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	R	-	R	-	-
2.4	<i>Burkholderia cepacia</i> complex <sup>b</sup>	R	R	R	R	-	-	R	R	R	-	R	-	-	R	-	R <sup>c</sup>	-	-	-	-	-
2.5	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	R	-	R	R	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.6	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	R	R	R	R	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	Note <sup>d</sup>	R <sup>e</sup>	-	-	-	-
2.7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	R	R	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	R <sup>f</sup>	R <sup>g</sup>	R	R	-	-

R, resistant.  
<sup>a</sup>*Acinetobacter baumannii* may appear to be susceptible to ampicillin-sulbactam, owing to the activity of sulbactam against this species.  
<sup>b</sup>*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.  
<sup>c</sup>*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.  
<sup>d</sup>*Pseudomonas aeruginosa* is intrinsically resistant to kanamycin and neomycin, owing to low-level APH(3)-IIb activity.  
<sup>e</sup>*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.  
<sup>f</sup>*Stenotrophomonas maltophilia* may show low ceftazidime MIC values but should be considered to be resistant.  
<sup>g</sup>*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. Není třeba měřit zóny, jsou již změřeny.

# EUCAST = The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**Na včívku 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 ciprofloxacínu 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)	<b>výsledek není v souladu, kmen je třeba dát do výsledku jako „rezistentní“, můžeme hovořit o „falešné citlivosti“</b>

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 ___ ( <i>S. maltophilia</i> ) je podle EUCAST primárně rezistentní na tato antibiotika: _____ _____ Citlivost zjištěná difusním diskovým testem s tímto <input type="checkbox"/> souhlasí (= není tu žádná „falešná citlivost“) <input type="checkbox"/> nesouhlasí v případě tohoto antibiotika či těchto antibiotik: _____ Kmen je citlivý na antibiotika: _____
Kmen ___ ( <i>B. cepacia</i> ) je podle EUCAST primárně rezistentní na tato antibiotika: _____ _____ Citlivost zjištěná difusním diskovým testem s tímto <input type="checkbox"/> souhlasí (= není tu žádná „falešná citlivost“) <input type="checkbox"/> 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 parafínu na povrchu), vyhodnoťte růst bakterií a jeho charakter.

Kmen			
Růst v bujónu			
Růst ve VL bujónu			
Závěr			