

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl pátý:

Gramnegativní zločinci II

Přehled lékařsky významných G - tyčinek

Příběh	Endo	Skupina
P04	roste	Enterobacterales (GLC +, OXI -)
P04	roste	<i>Vibrio a Aeromonas</i> (GLC +, OXI +)
P04	ne	<i>Campylobacter a Helicobacter</i>
3. + 4.	roste	G- nefermentující bakterie (GLC -, OXI +/-)
1. + 2.	ne	<i>Pasteurellaceae</i>
P06	ne	Další G- tyčinky, viz příští praktikum

Přehled témat

Klinická charakteristika – *Pasteurellaceae*

Klinická charakteristika – Gram– nefermentující bakterie

Diagnostika hemofilů a pasteurel

Diagnostika gramnegativních nefermentujících bakterií

Klinická
charakteristika –
Pasteurellaceae

Příběh první

- Čtyřletý Kubík je hodný kluk, ale jeho rodiče jsou členy jakési sekty a nechtějí Kubíka nechat očkovat. Nejraději by ho měli pořád doma, ale nakonec ho kvůli práci přece dali do školky...
- Po měsíci ve školce začal být Kubík nachlazený, a nakonec se začal dusit a sípavě dýchat. Volali RZP, záchranáři už uvažovali o koniopunkci, nakonec ale nebyla nutná. Ukázalo se, že Kubík má zánět příklopy hrtanové – nemoc, která se dnes už moc často nevidí...

Kdo to Kubíkovi udělal?

- Viník: *Haemophilus influenzae* ser. b (Hib)
- Hemofily jsou **krátké gramnegativní tyčinky**.
- Hemofily patří do čeledi *Pasteurellaceae* společně s rodem *Pasteurella* (viz dále) a některými dalšími bakteriemi, jako je *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, podílející se na některých specifických gingivitidách, nebo *Aggregatibacter aphrophilus*, dříve považovaný za hemofila a mající podobný význam jako *Haemophilus parainfluenzae* (viz dále)
- Rody *Haemophilus* a *Aggregatibacter* se také řadí do skupiny HACEK.


Skupina HACEK

- Organismy označované jako HACEK jsou **špatně rostoucí gramnegativní bakterie**. Způsobují **některé případy infekční endokarditidy**, zvláště při negativním výsledku kultivace.
- Nejsou běžné ani jako původci endokarditid (uvádí se, že mohou za nanejvýš tři procenta z nich), jejich nebezpečí ale spočívá v jejich **obtížné diagnostice**. Zahrnují rody:
 - *Haemophilus* (*H. haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, ale i *H. influenzae*)
 - *Aggregatibacter* (*A. actinomycetemcomitans*, *A. aphrophilus*, *A. segnis*)
 - *Cardiobacterium* (*C. hominis*)
 - *Eikenella* (*E. corrodens*)
 - *Kingella* (*K. denitrificans*, *K. kingae*)
- Nejsou taxonomicky příbuzné. První dva patří do čeledi *Pasteurellaceae*, zatímco *Cardiobacterium* je zařazeno do čeledi *Cardiobacteriaceae* a poslední dvě patří do *Neisseriaceae*.

Klasifikace hemofilů

- *Haemophilus influenzae*
 - **pouzderný typ b (Hib) – proti tomu se očkuje**
 - pouzderné typy a, c, d, e, f
 - neopouzdržené kmeny
- *Haemophilus parainfluenzae* (mnohem běžnější a mnohem méně patogenní)
- *Haemophilus ducreyi*, původce pohlavně přenášené choroby **ulcus molle**

Patogenita hemofilů

- Nejzávažnější hemofilové choroby jsou **epiglottitis, meningitis a sepse**. Způsobuje je hlavně *Haemophilus influenzae*, serotyp b. 
- Další časté choroby jsou **otitis media a sinusitis** (zde po *Streptococcus pneumoniae* a společně s *Moraxella catarrhalis*)
- Velmi běžná je **přítomnost hemofilů v krku**, přičemž patogenní role je velmi pochybná. Zvláště v případě *Haemophilus parainfluenzae* nepředpokládáme, že by byl patogenem.

Ulcus molle

- Je to pohlavní choroba, vyskytující se především v subtropických a tropických oblastech

Více o měkkém vředu

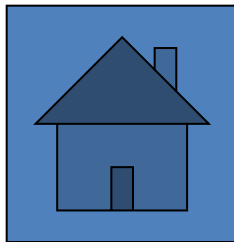
- **Pozor – nezaměňujte:**
- **Ulcus molle – měkký vřed (šankroid)** – způsoben *Haemophilus ducreyi*
- **Ulcus durum – tvrdý vřed (šankr)** – jeden z příznaků syfilis, způsobené *Treponema pallidum*

Příběh druhý

- Jana se zase jednou toulala v zahradách. Bohužel, jeden plot byl příliš rezivý a pes za ním příliš silný. Pes utekl ven a narazil právě na Janu. **A tak skončila Jana s pokousanou nohou.**
- Majitelé prokázali, že pes je očkovaný proti vzteklině. Avšak **v ráně se brzy objevil hnis.** Ten pak byl poslán do laboratoře. A zločincem byla...

Pasteurella multocida

- Je běžnou flórou v psích tlamách.
- U člověka způsobuje zejména zhnisání ran po **pokousání psem** či jiným zvířetem.
- Má charakteristický pach, podobný hemofilovému (někteří ho spíše přirovnávají k pachu starého hadru), ale na rozdíl od něj roste na krevním agaru (nikoli však na Endově půdě)
- Kolonie na krevním agaru vypadají jako něco mezi streptokokem a enterokokem, ale je rezistentní na **vankomycin**, což obvykle mikrobiologa „trkne“, zejména při současné citlivosti na penicilin



Klinická
charakteristika –
gramnegativní
nefermentující
bakterie

Příběh třetí

- **Pan Zápalka** je pyroman. Nedávno na svou vášeň doplatil a nehezky se popálil. Nyní se mu **popálenina zanítla**. Leží na popáleninovém centru a je na tom velice špatně. Lékaři naštěstí pochopili, že běžná antibiotika jsou mu platná jako mrtvému zimník a **provedli stěr**. Díky tomu se podařilo najít **cílenou terapii** a pana Zápalku vyléčit – do doby, než zase něco zapálí a způsobí si další popáleniny.

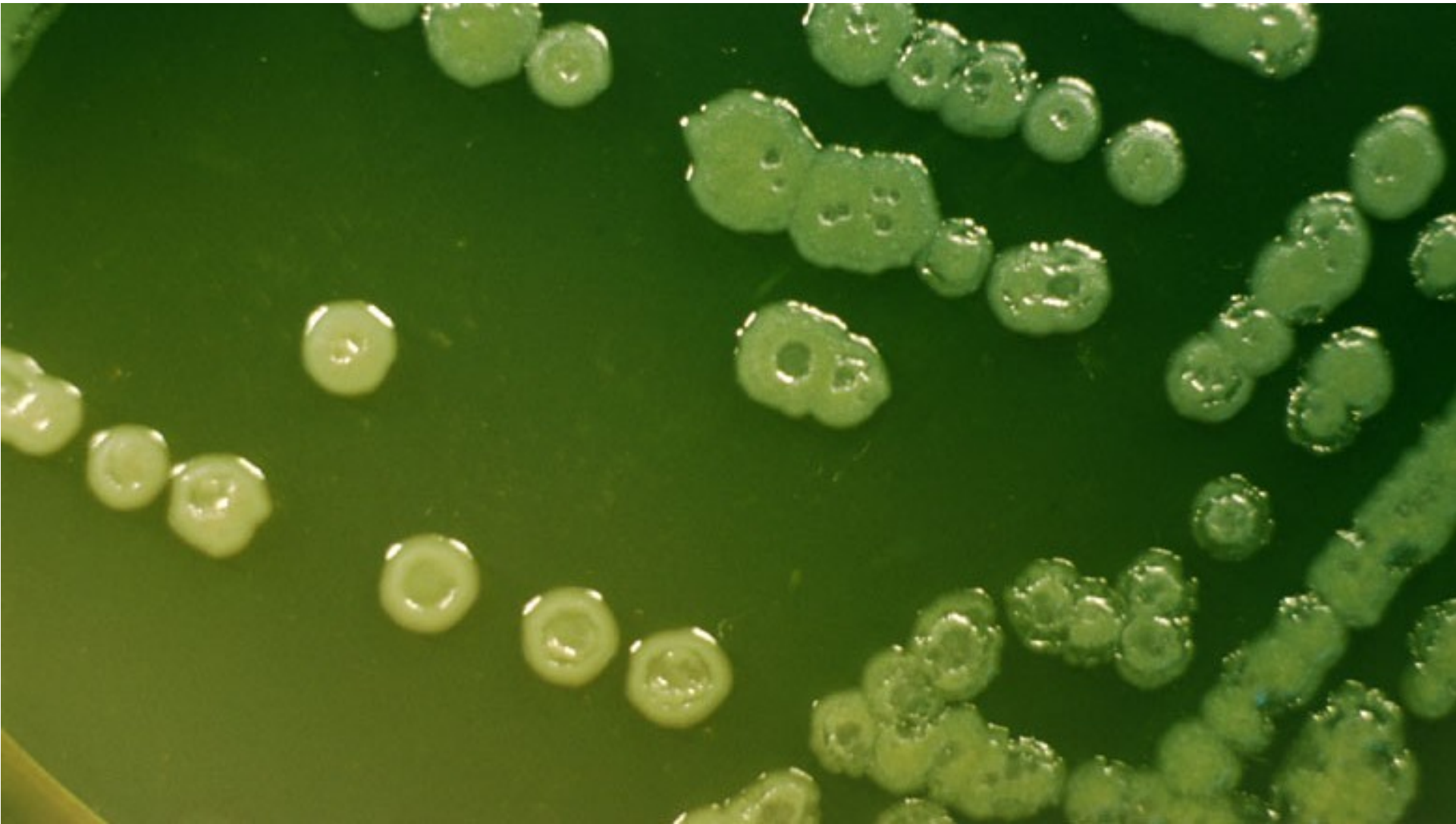
Kdo za to tentokrát může?

- Viníkem je *Pseudomonas aeruginosa*, nejběžnější bakterie ze skupiny gramnegativních nefermentujících bakterií
- Viníkem by stejně dobře mohla být i kterákoli jiná bakterie z této skupiny, např. *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia* nebo *Stenotrophomonas maltophilia*
- Tyto bakterie jsou většinou striktně aerobní, nefermentují, nýbrž 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

Zeleně pigmentovaný kmen

Pseudomonas aeruginosa na MH

Foto:
Mikrobiologický
ústav, foto prof.
Skalka



Patogenita G– nefermentujících

- Obecně: Jsou to bakterie z vnějšího prostředí, často rostlinné patogeny, „bakterie-zbabělci“, které si netroufnou na zdravého člověka – takovým říkáme *oportunní patogeny*. Jejich terčem jsou pacienti s popáleninami, klienti ARK, JIP, transplantačních center a podobně.
- U dlouhodobě hospitalizovaných nezpůsobují jen infekce ran, ale často je nacházíme i např. v dýchacích cestách či dokonce v krevním řečišti.
- 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 nálezu některé z těchto bakterií

Příběh čtvrtý

- Linda bylo ubohé děvče: trpěla **vrozenou chorobou – cystickou fibrózou**.
- Její **plicní surfaktant se lišil od surfaktantu zdravých lidí**. A tak byla často nemocná.
- Posledně to byl *Staphylococcus aureus*. Tentokrát to bylo jiné: **původcem byla *Burkholderia cepacia***, jedna z G– nefermentujících tyčinek
- ***Burkholderia cepacia*** způsobuje hnilobu cibule (***Allium cepa***), je to tedy typický rostlinný patogen
- Rod *Burkholderia* také zahrnuje druh *B. mallei*, což je původce **vozhřivky**, a druh *B. pseudomallei*, který způsobuje **melioidózu**

Další nefermentující

- Kromě rodů *Burkholderia* a *Pseudomonas* patří mezi významné G- nefermentující také *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii* komplex, *Acinetobacter Iwoffii* a další
- ***Stenotrophomonas maltophilia*** je dlouhé jméno, ale snadno si ho zapamatujete: je to „úzké-výživy-jednotka maltózu-milující, čili „bakteriální panda“, místo bambusu žvýkající maltózu 😊
- ***Acinetobacter*** má své jméno odvozeno z řečtiny (a-kineto- = nepohyblivý)

Nefermentující a cystická fibróza

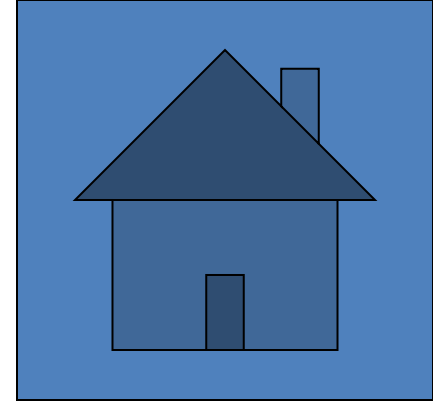
- Cystická fibróza je těžké, **vrozené onemocnění plic** s poruchou produkce normálního plicního surfaktantu. To vede ke změněným charakteristikám plic, včetně mnohonásobně zvýšeného rizika infekce
- **Nejčastějšími původci** jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* a *Staphylococcus aureus*. Kmeny zpravidla získají **polyresistenci** a mnohé děti umírají velmi mladé.

Metabolismus bakterií a jejich vztah ke kyslíku

Jak již víme, G⁻ nefermentující bakterie provádějí aerobní respiraci. Porovnejme nyní dvě bakterie:

- *Escherichia coli* žije ve střevě. Má dost živin, ale málo kyslíku (i když jiných plynů si užije dost 😊) preferuje fermentaci glukózy i jiných cukrů. ***Escherichia coli* je fakultativně anaerobní.** Některé další bakterie žijící ve střevě jsou **striktně anaerobní.**
- Naopak pseudomonády mají kyslíku habaděj, ale živin málo. Volí tedy aerobní respiraci, která jim umožní to málo dostupných živin využít úplně. **Pseudomonády jsou striktně aerobní**

Pseudomonas jako striktní aerob (na rozdíl od jiných)



- Pseudomonáda (I) je striktně aerobní bakterie, nikoli fakultativně anaerobní jako například *Escherichia coli* (kmen III), natož striktně anaerobní jako kmen II (*Bacteroides fragilis*, viz P07).

Kmen	Bujón	VL-bujón	Výsledek
I	roste	neroste	Striktně aerobní bakterie
II	neroste	roste	Striktní anaerob
III	roste	roste	Fakultativní anaerob

Diagnostika hemofilů a pasteurel

Přehled metod použitelných k dopadení bakterií čeledi *Pasteurellaceae*

- Přímé metody
 - Mikroskopie – krátké G– tyčinky
 - Kultivace – *Pasteurellaceae* nerostou na Endově agaru, hemofily dokonce ani na krevním (s výjimkou současné kultivace s jiným mikroblem)
 - Biochemická identifikace – je možno ji použít
 - Antigenní analýza – používá se u hemofilů (Hib)
 - Detekce DNA – rutinně se nepoužívá

Nepřímé metody se téměř nepoužívají

Odlišení čeledi *Pasteurellaceae* (diferenciální diagnostika)

- Gramovo barvení odliší gramnegativní tyčinky od ostatních bakterií
- Endova půda: jak již víme, rostou na ní z klinicky významných jen enterobakterie, příslušníci čeledi *Vibrionaceae* a gramnegativní nefermentující tyčinky, to tedy znamená, že ***Pasteurellaceae* tam nerostou**
- *Pasteurellaceae* prozradí zápach a různé další vlastnosti (biochemické, citlivost na antibiotika)

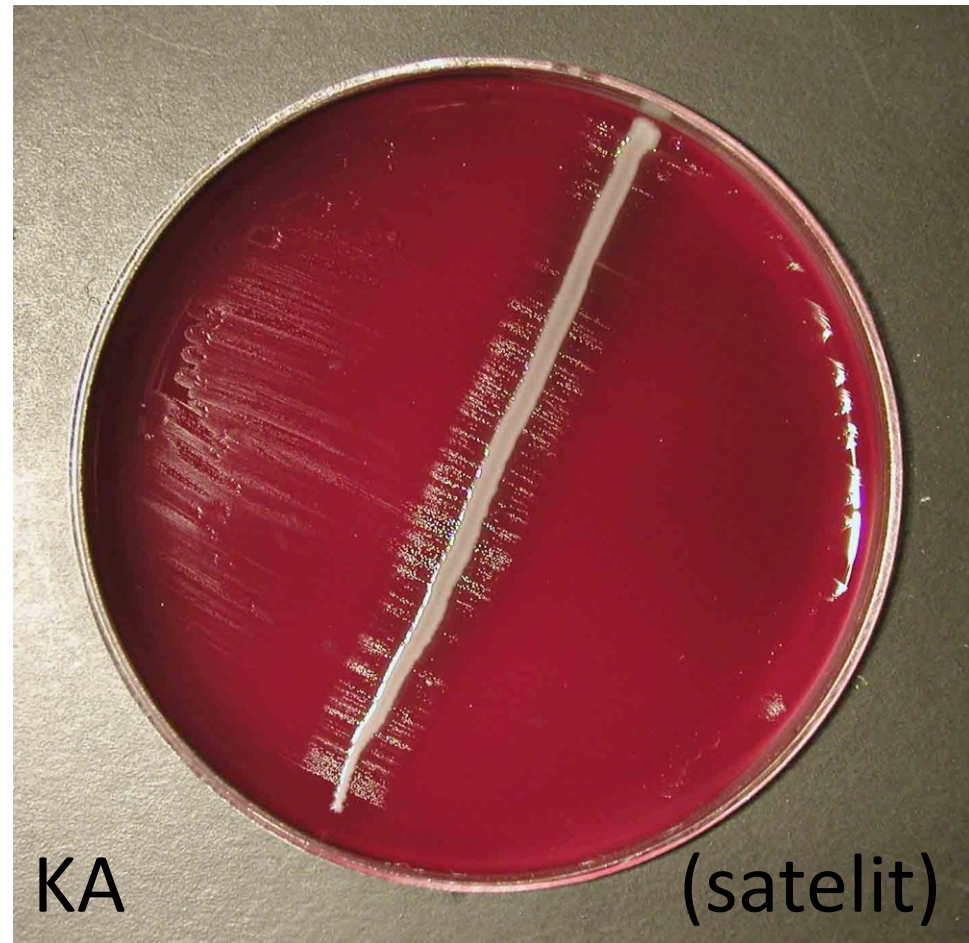
K diagnostice hemofilů a pasteurel

- **Pasteurely** rostou na krevním agaru
- **Hemofily** na krevním agaru růst neumějí, protože si neumějí „otevřít“ krvinku
- Rostou tedy na **čokoládovém agaru**
- Na KA rostou v přítomnosti takové bakterie, která jim krvinku „otevře“ (**satelitový fenomén**). Takovou bakterií je například zlatý stafylokok
- Mají **droboučké kolonie**, proto se používá disk k odclonění ostatních bakterií (**bacitracin**, ale ve vyšší koncentraci než v bacitracinovém testu)

Satelitový fenomén

- Jak už víme, hemofily potřebují faktory z erytrocytů, ale nejsou samy schopny je narušit. Narušení může obstarat
 - zahřátí agaru (čokoládový agar)
 - přítomnost jiného mikroba
- **Satelitový fenomén** představuje tu druhou možnost, jak může hemofil získat faktory z krvinek. Znamená růst hemofila pouze kolem stafylokokové čáry.
- Přítomnost satelitového fenoménu je důkazem, že jde opravdu o příslušníka rodu *Haemophilus*

Hemofily – vlevo na čokoládovém agaru, vpravo jako satelit na KA

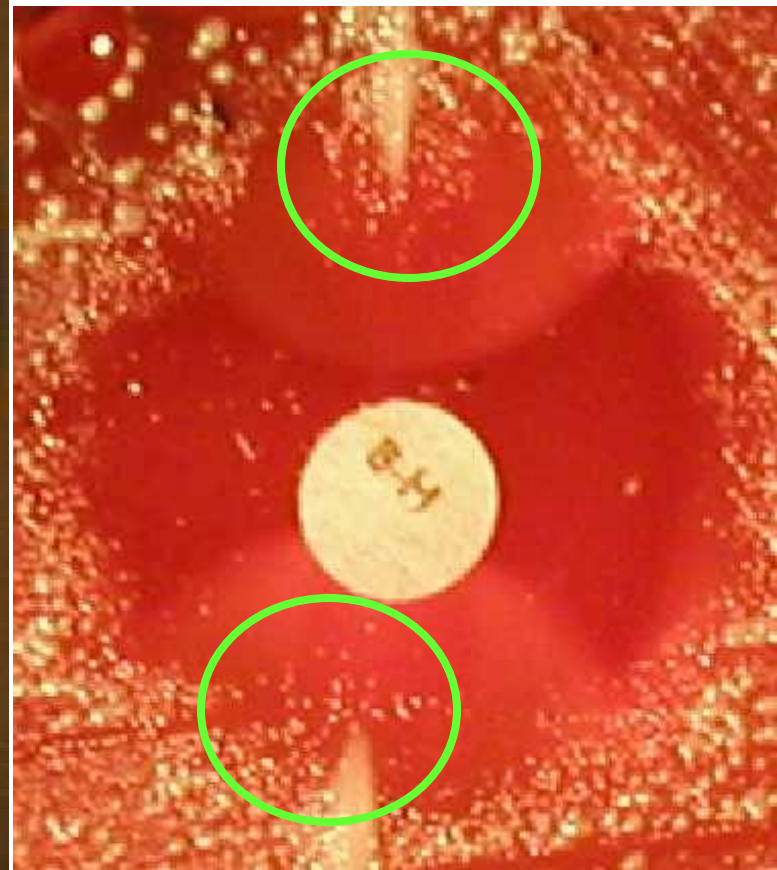


Detekce hemofilů

Hemofily jsou rezistentnější než bakterie běžné flóry, takže rostou uvnitř zóny, ovšem jen kolem stafylokokové čáry (satelitový fenomén)



Foto:
Mikrobiologický
ústav



Růstové faktory hemofilů

(test zahrnuje také *Aggregatibacter aphrophilus*,
dříve *Haemophilus aphrophilus*)

- Testované bakterie vyžadují faktory z krvinek, avšak jejich potřeba konkrétních faktorů je specifická:
 - *H. parainfluenzae* vyžaduje faktor V (= NAD)
 - *A. aphrophilus* vyžaduje faktor X (= hemin)
 - *H. influenzae* vyžaduje oba faktory.
- Používáme disky s těmito faktory: jeden s faktorem X, druhý s V, a třetí se směsí obou.

Test růstových faktorů hemofilů

Jeden disk obsahuje faktor X, druhý faktor V, třetí směs obou

Aggregatibacter

H. influenzae (vlevo),
H. parainfluenzae (vpravo)

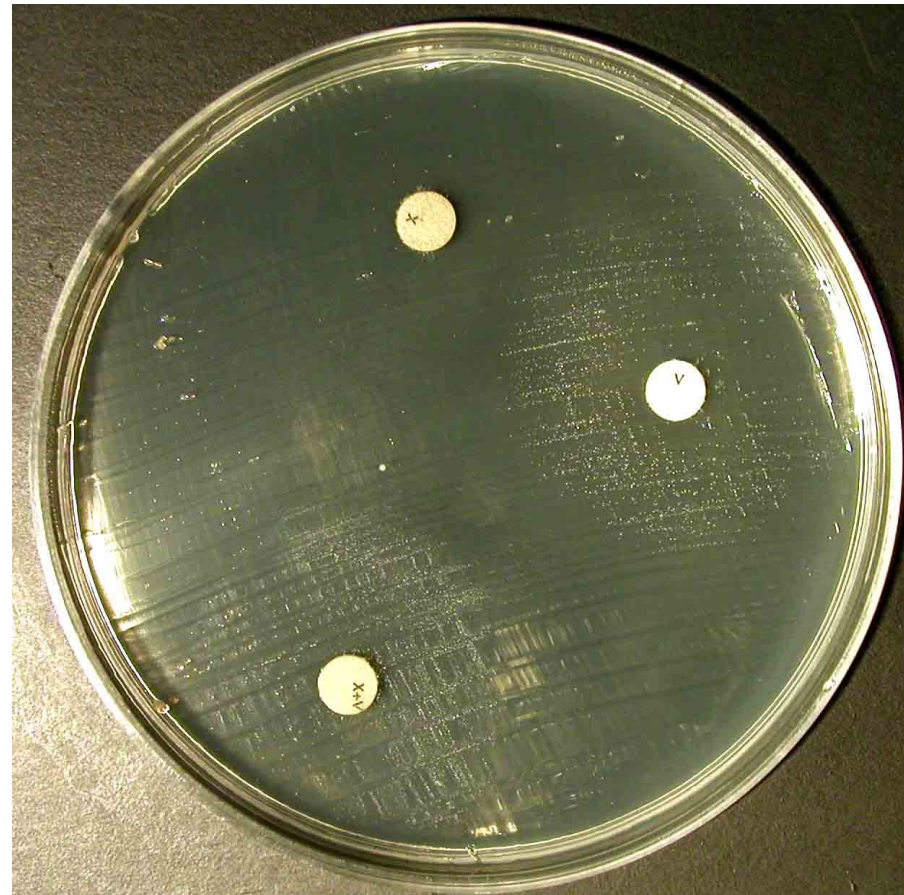
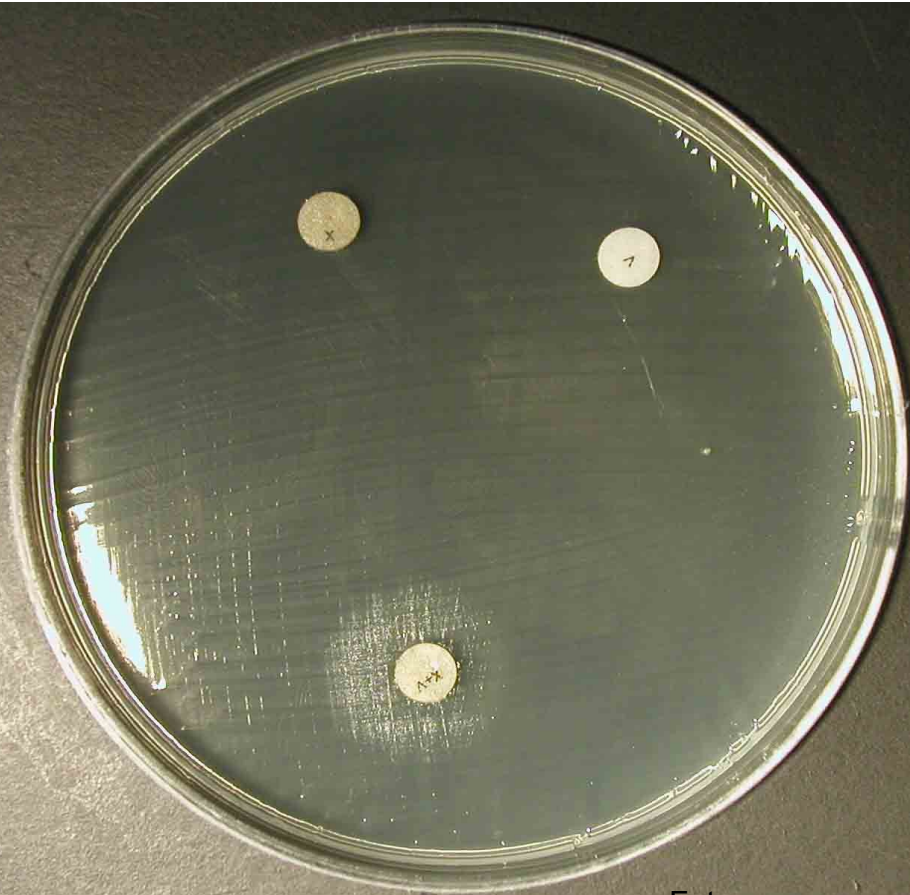


Foto:

Antigenní analýza hemofilů

- Antigenní analýza se u hemofilů provádí obdobným způsobem jako u jiných bakterií. Dnes jsou zpravidla k dispozici **komerční soupravy**, obsahující např. i latexové částice a další součásti
- Dříve se využívalo jevu tzv. **koaglutinace se stafylokokem**, kdy aglutinát byl hustší díky navázání stafylokoka na Fc konec protilátky proti hemofilovi

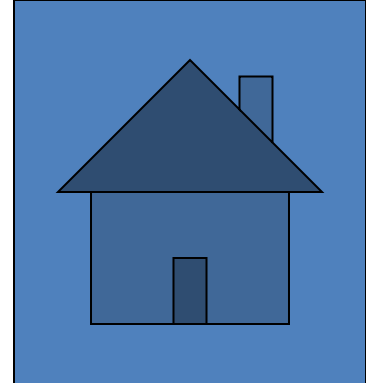
Detekce druhu *Pasteurella* typickým vzorcem citlivosti

- **Žádné gramnegativní bakterie nejsou citlivé na vankomycin.** Vankomycin lze použít jen u grampozitivních, avšak zde je silný: všechny streptokoky a většina stafylokoků a enterokoků je citlivá.
- Na druhou stranu, **jen málo bakterií je citlivých na penicilin, zvláště mezi G– tyčinkami.**
- **Kombinace citlivosti k penicilinu a rezistence k vankomycinu je poměrně specifická pro rod *Pasteurella*.**

Testy antibiotické citlivosti

- Hemofily **nerostou** na MH agaru
- Zpravidla se používá **Levinthalův agar** (přefiltrovaný čokoládový agar), na kterém jsou zóny lépe viditelné než na klasickém čokoládovém agaru
- V naší laboratoři se používá „**hemofilový agar**“, což je půda blízká agaru Levinthalovu

Typická sestava antibiotik pro léčbu hemofilových infekcí



Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna
Penicilin (penicilin)	P	$C \geq 12 / R < 12$
Ko-amoxicilin (penicilin)	AMC	$C \geq 15 / R < 15$
Cefuroxim (CS II. gen.)	CXM	$C \geq 26 / R < 25$
Kys. nalidixová (chinolon)**	NA	$C \geq 23 / R < 23$
Tetracyklin (tetracyklin)*	TE	$C \geq 25 / R < 22$
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	$C \geq 23 / R < 20$
*platí i pro doxycyklin **platí pro všechny chinolony		

Diagnostika
gramnegativních
nefermentujících
bakterií

Přehled metod používaných u G–nefermentujících bakterií

- Přímé metody
 - **Mikroskopie** – většinou jsou to G– tyčinky, ale *Acinetobacter* je G– kok
 - **Kultivace** – „nefermentující“ rostou na většině půd včetně krevního agaru. Jakožto glukózu nefermentující jsou většinou také laktózu nefermentující, ovšem kolonie některých z nich jsou kvůli pigmentaci poměrně tmavé
 - **Biochemická identifikace** – možná, ale je potřeba použít testy, zjišťující aerobní respiraci (ne fermentaci). Je také nutno použít sníženou teplotu a prodlouženou inkubaci
 - **antigenní analýza, detekce DNA** – rutinně se nepoužívají

Nepřímé metody se používají zřídka

Odlišení G– nefermentujících (diferenciální diagnostika)

- Gramovo barvení: **Gram– tyčinky** × jiné bakterie
- Endova půda: **rostou** (více později)
- Nefermentující se odliší od enterobakterií/vibrií tím, že nefermentují glukózu. Typické pro G– nefermentující je **chybění jakékoli změny na Hajnově půdě** (zůstává červená, **případná nahnědlá barva nevadí, je dána přítomností pigmentů**)

Bližší určení jednotlivých rodů a druhů G– nefermentujících

- **Pseudomonády** se zpravidla poznají:
 - Mají typickou **vůni** (mladé kultury)
 - Tvoří **pigmenty**, nejčastěji **zelené**, někdy modré či rezavé. Nejlépe jsou viditelné na MH, ale trochu i na KA či Endově agaru
 - Mají pozitivní **oxidázu**
- **Ostatní nefermentující**, případně sporné pseudomonády, musíme rozlišit biochemicky, například NEFERMtestem 24 (v kombinaci s oxidázovým testem)

Pseudomonády na MH agaru a ostatních půdách

- Uvědomte si, že MH agar je sám o sobě téměř bezbarvý, resp. lehce nažloutlý.
- Vše zelené, co vidíte na agaru, je výtvořem pseudomonády, resp. jejího pigmentu pyoverdinu
- Na KA a Endu se tvorba pigmentu projevuje méně, ale projeví se také. Na těchto půdách je zato typický perleťový lesk kolonií.

Oxidázový test u nefermentujících

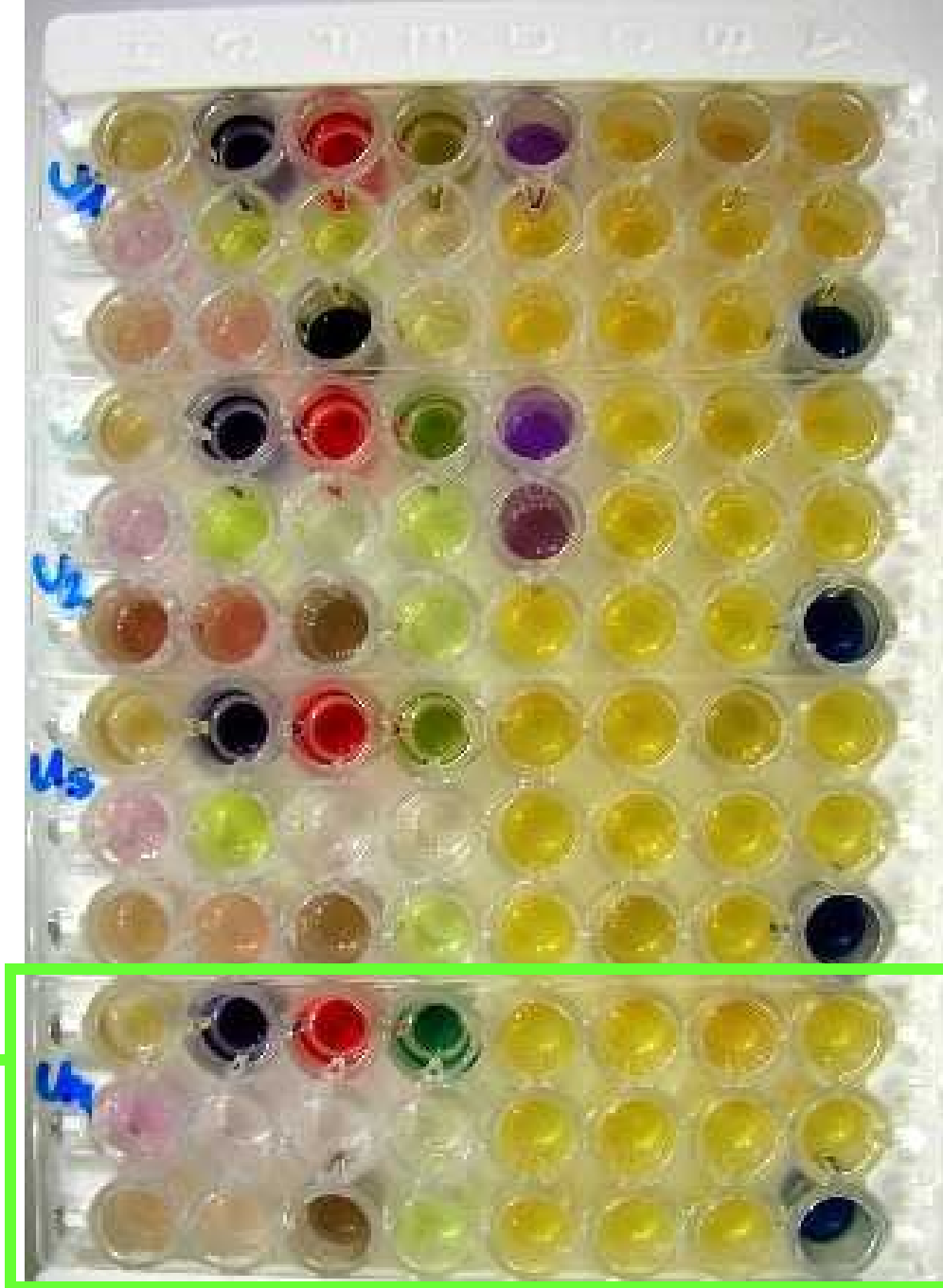
- Z nejběžnějších G– nefermentujících tyčinek má *Pseudomonas* oxidázu pozitivní, *Burkholderia* zpravidla také; *Stenotrophomonas* většinou ne a *Acinetobacter* také nikoli.

NEFERMtest 24

- Pro přesnou biochemickou identifikaci G–nefermentujících užíváme většinou Nefermtest 24 (nebo podobný jiných výrobců).
- Je to trojstrip (ne dvojstrip jako minulý týden)
- Kód se tu tvoří poněkud jiným způsobem:
 - první číslice je 0 (oxidáza –) nebo 1 (oxidáza +)
 - dalších 6 číslic pochází ze sloupců H až C
 - sloupce B a A se nepočítají (používají se jen pro případné další rozlišení)

NEFERMtest 24

Do jednoho rámečku lze vložit čtyři trojřádky pro čtyři kmeny, každý se identifikuje pomocí 24 reakcí



Atb citlivost nefermentujících

- G– nefermentující naopak **rostou ochotně na nejrůznějších médiích**
- Pro testování i léčbu používáme poměrně silná antibiotika, nevhodná pro léčbu infekcí způsobených běžnými bakteriemi
- Konkrétně se tu používají
 - **cefalosporiny 3. generace*** (ale jen některé, tzv. „protipseudomonádové“, jako je ceftazidim)
 - **protipseudomonádové peniciliny, monobaktamy a karbapenemy*** (imipenem, piperacilin/tazobactam)
 - **aminoglykosidy** (gentamicin, amikacin)
 - **fluorochinolony** (ciprofloxacin, ofloxacin)
 - **polypeptidy** (kolistin)

**a jejich kombinace s inhibitory betalaktamáz*

Typická sestava atb používaných proti pseudomonádám

Antibiotikum	Zkratka	Referenční zóna (mm)
Piperacilin+tazobaktam*	TZP	$C \geq 18 / R < 18$
gentamicin (amonoglykosid)	CN	$C \geq 15 / R < 15$
ofloxacin (chinolon)	OFL	$C \geq 16 / R < 13$
ciprofloxacin (chinolon)	CIP	$C \geq 26 / R < 26$
ceftazidim (CS III gen.)	CAZ	$C \geq 17 / R < 17$
kolistin (polypeptid)	CT	$C \geq 11 / R < 11$
*protipseudomon. penicilin + inhibitor β -laktamázy		

Na obrázku je *Pseudomonas aeruginosa* pravděpodobně citlivá na všechna testovaná antibiotika; je to však možné jen proto, že jsou testována jen speciální protipseudomonádová léčiva. I tak se vyskytují polyrezistentní kmeny sekundárně rezistentní i k nim.



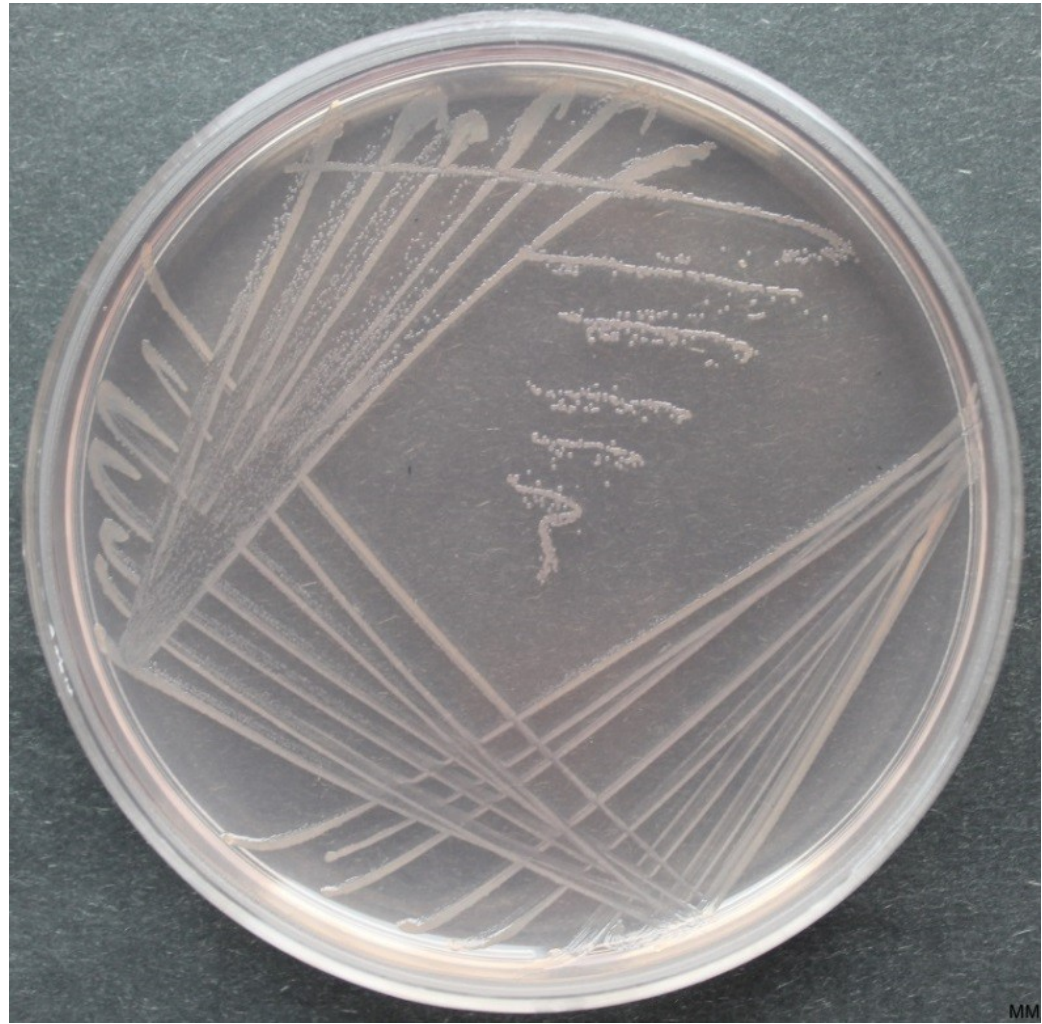
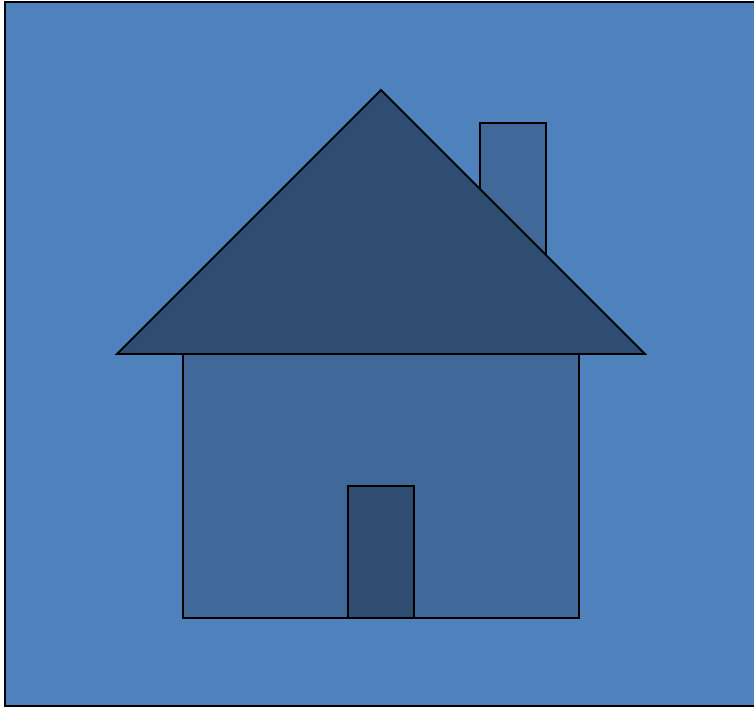
Zejména producenti takzvaných metalo-betalaktamáz (MBL) jsou často citliví jen na amikacin a kolistin

Testování citlivosti je možné i E-testem
(na obrázku) nebo mikrodilučním
testem



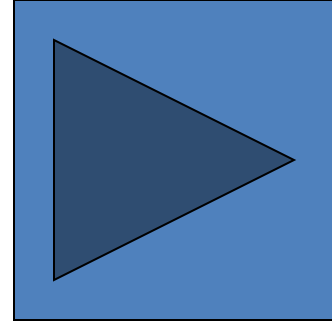
Foto: Mikrobiologický
ústav

Konec



Burkholderia cepacia, foto: Mikrobiologický ústav

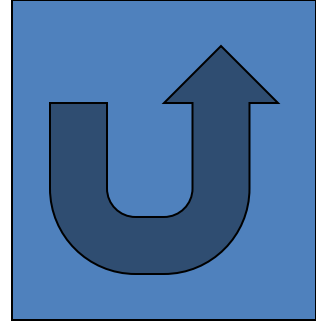
Zánět středního ucha – otitis media (bonus)



- **Častý u dětí** (krátká vodorovná Eustachova trubice)
- **Původci:** *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*
- **U chronických** se mohou uplatnit i některé gramnegativní tyčinky

Nutno odlišit záněty boltce a zevního zvukovodu: tady je původcem hlavně Staphylococcus aureus (jako u jiných zánětů kůže), léčba lokálně např. framykoin kapky

Vyšetřování a léčba infekcí středního ucha



- **Léčba** má smysl, pokud jde o skutečně prokázaný zánět (bolest, zarudnutí, horečka) a nereaguje na protizánětlivou léčbu
- **Lékem volby** je amoxicilin (např. AMOCLEN), alternativou může být ko-trimoxazol
- Vyšetřovat **výtěr ze zvukovodu** má smysl pouze po provedené paracentéze (propíchnutí bubínku)
- Jinak má samozřejmě smysl vyšetřit **hnisavou tekutinu**, která je při paracentéze odebrána