

Téma P05: Diagnostika *Pasteurellaceae* a G– nefermentujících tyčinekKe 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. <i>H. influenzae</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 (*demonstrační misku s naočkovanými, avšak nevyrostlými kmeny, naleznete na bočním stole*), popíšete na čokoládovém agaru.

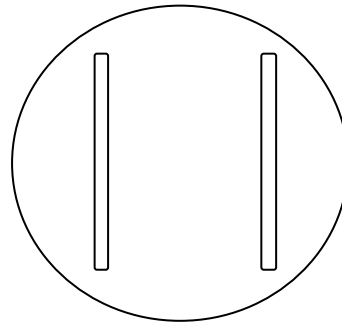
Poté popíšete růst na Endově půdě: „-“ pokud nerostou, „L-“ pokud rostou, ale nefermentují laktózu „L+“ pokud laktózu fermentují. Dejte pozor: některé kmeny mohou předstírat pozitivitu laktózoového testu, ačkoli jsou laktóza negativní: produkují pigmenty, takže kolonie jsou tmavé, avšak okolí je světlé.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

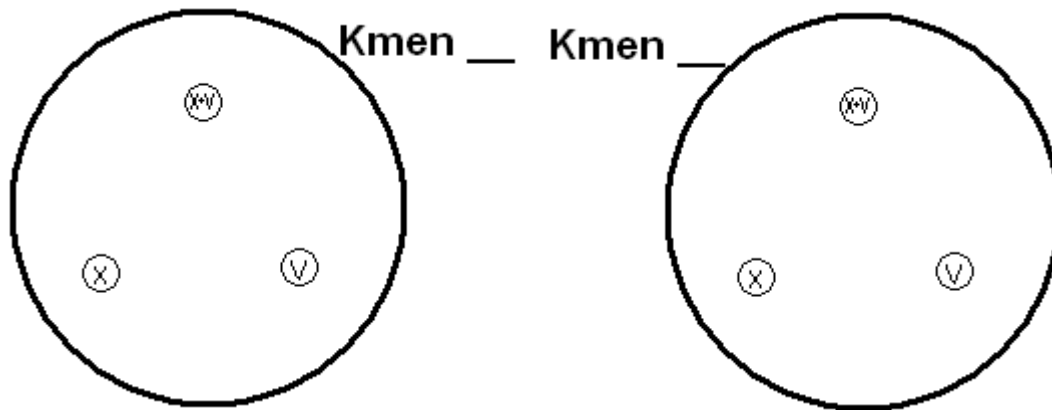


Staphylococcus aureus

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⁻ 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 – 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⁻ 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		
Ciprofloxacín (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 (GN) 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			