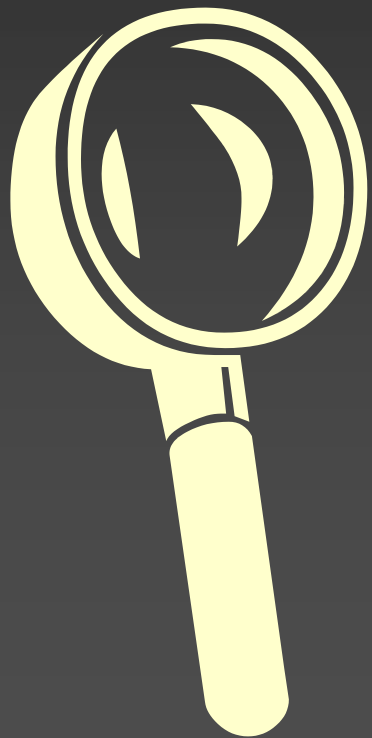


Než doopravdy začneme:

- Zapalte si kahany. Každý pŕlstŕl si vezme jedno podloŕní sklŕčko a kápne na něj MALOU kapku fyziologického roztoku. Na každém stole obarvĕte oba kmemy.
- Udĕlejte POUZE TOTO, nepokraĕujte v barvení – to budeme dĕlat aŕ po vŕkladu!

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl pátý:

Gramnegativní zločinci II

Opět začneme testíkem...

- Které jsou klinicky významné G+ koky?

Stafylokoky, streptokoky, enterokoky

- A které klinicky významné G+ tyčinky?

Např. listerie, koryneformní tyčinky, bacily

- A co obligátně patogenní enterobakterie?

Yersinie (hlavně *Y. p.*), shigely, salmonely (AP!)

- A nějaké potenciálně patogenní?

Escherichie, klebsiely, enterobaktery, serracie, protey, providencie, morganely, citrobaktery...

Testík pokračuje...

- Je rozdíl mezi enterokokem a enterobakterií?

Setsakramentský! Enterokok je G + kok, enterobakterie, včetně rodu *Enterobacter*, jsou gramnegativní tyčinky. Ovšem, všechny mají nějaký vztah ke střevu obratlovců (stejně jako enteroviry)

- Které bakterie rostou na Endově půdě?

Enterobakterie, *Vibrionaceae*, G- nefermentující

- Jak je vzájemně rozlišíme?

Nefermentující nefermentují glukózu, vibria jsou OX +

- Jak poznáme fermentaci glukózy?

Například půda dle Hajny při kultivaci nefermentujících zůstane červená. (Existují i různé další testy.)

A testík ještě pokračuje...

- V čem všem je užitečná Endova půda?

Jednak na ní rostou jen NĚKTERÉ G- tyčinky, jednak rozliší L+ a L- bakterie, což je zejména při diagnostice enterobakterií velká výhoda.

- Které půdy se používají v dg. enterobakterií?

CIN (yersinie), XLD, MAL aj. (salmonely)

- Co udělat, když půdy nestačí?

Biochemické určení (u nás např. Enterotest 16)

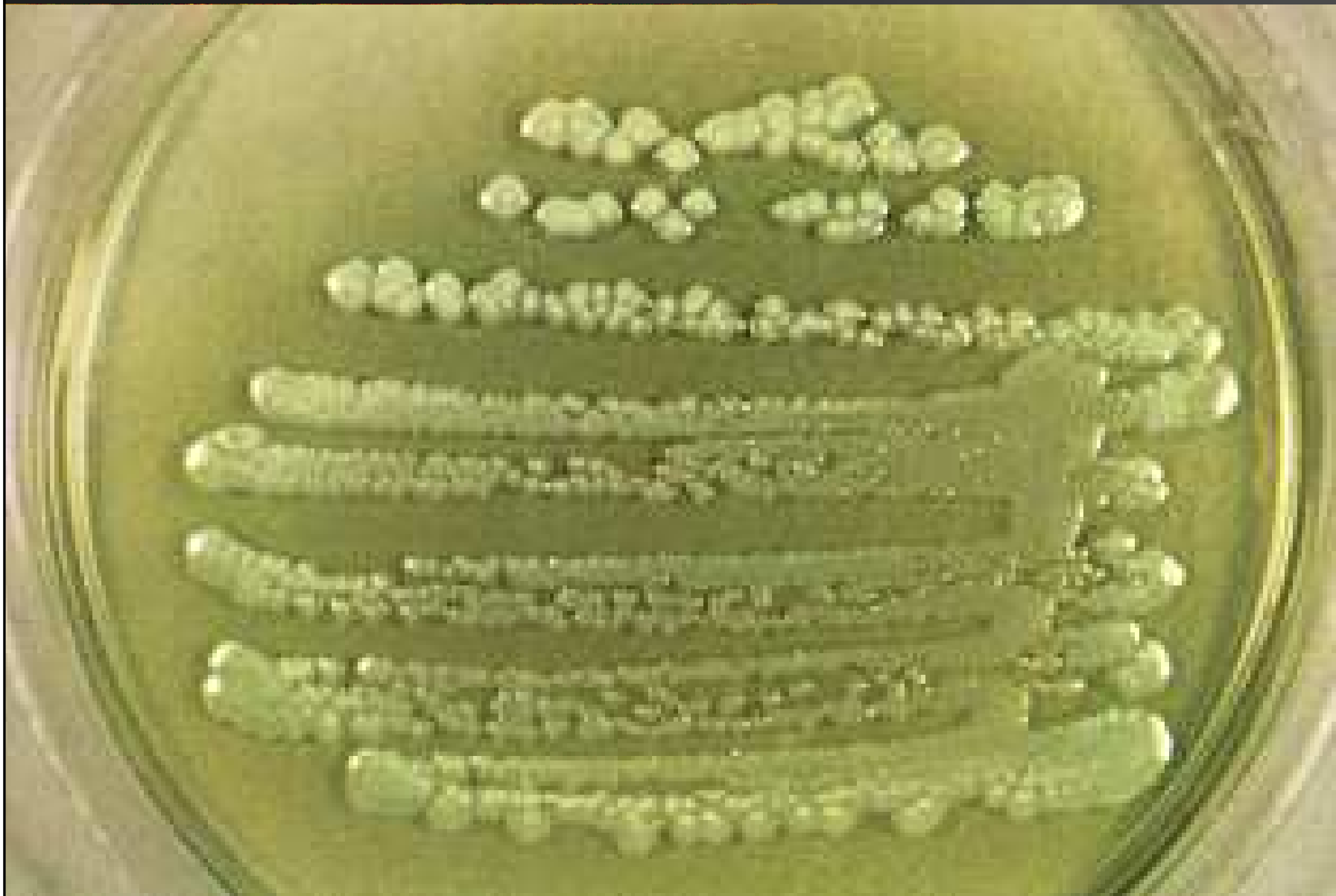
- Jak odlišíme EPEC? A jak *S. Enteritidis*?

V obou případech antigenní analýzou na skle

Na začátek motto...

Bylo nevlídno, že by PSAE ven
nevyhnal...

(PSAE – zkratka pro *Pseudomonas aeruginosa*)



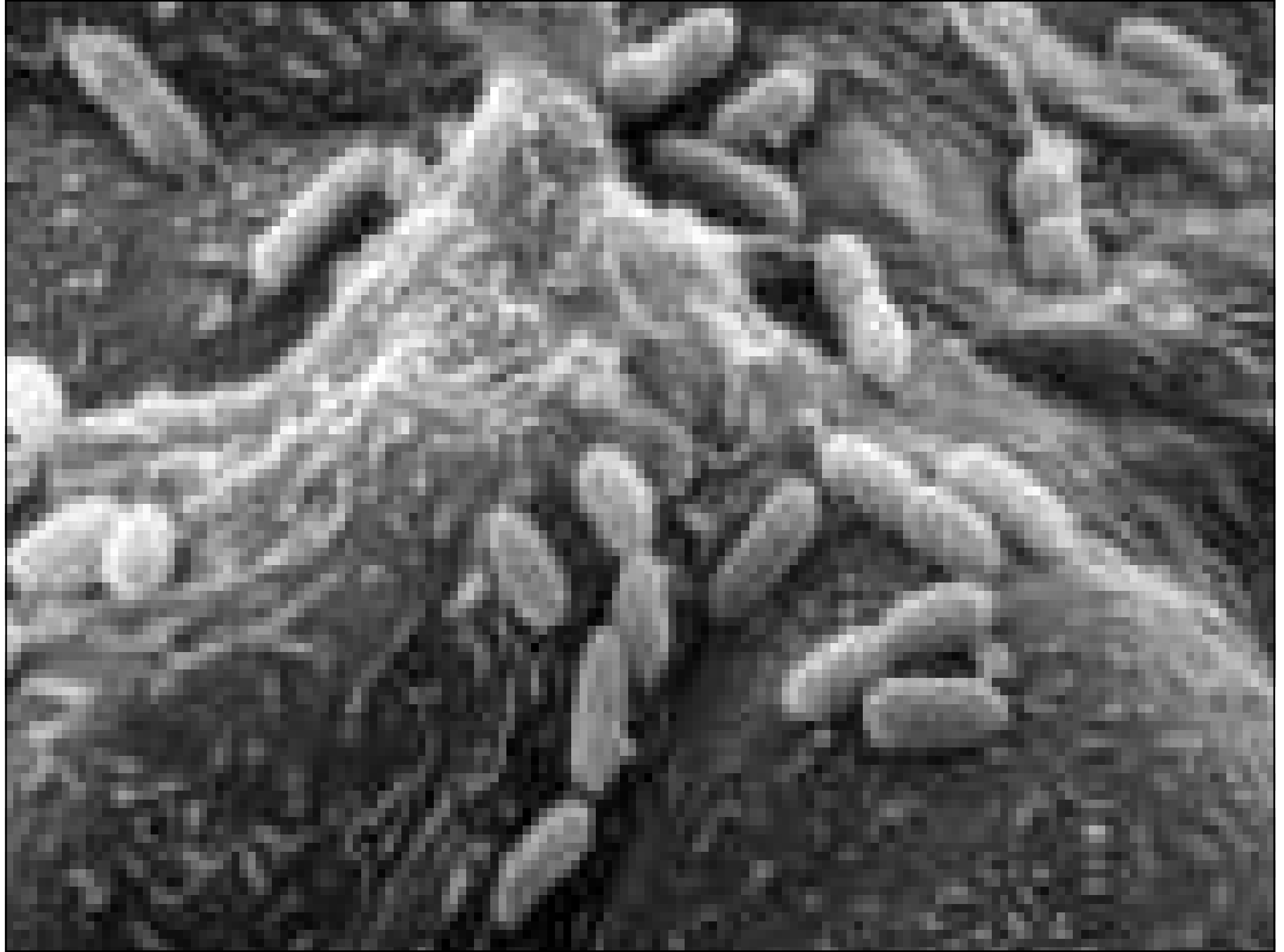
Příběh první



- **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 přece dali do školky...
- Po měsíci ve školce **začal být Kubík nachlazený**, smrkal, kašlal, a nakonec se začal dusit a sípavě dýchat. Volali RZP, ukázalo se, že **Kubík má zánět příklopky hrtanové** – nemoc, která se dnes už moc často nevidí...

Kdo to Kubíkovi udělal?

- Viník: *Haemophilus influenzae* serotyp b (Hib)
- Hemofily jsou **krátké gramnegativní tyčinky**. Nerostou na Endu, ale dokonce ani na KA
- Ze všech hemofilů je nejhorší *H. influenzae*. Ze všech kmenů *H. influenzae* jsou nejhorší kmeny **opouzdřené**. A ze všech opouzdřených pak ty, které vlastní **pouzderný typ b**
- Způsobují **epiglottitidy, meningitidy a sepse**. Ale zároveň hemofily (zvláště ty, které nepatří mezi „Hib“) jsou **úplně běžně nalézány v krcích**.



Čeď *Pasteurellaceae*: Pasteurely a hemofily

- *Pasteurella multocida* je běžnou flórou v psích tlamách. U člověka způsobuje zejména zhnisání ran po pokousání psem či jiným zvířetem. Má podobný **charakteristický pach jako hemofil**, ale na rozdíl od něj roste na krevním agaru. **Vypadá tam jako něco mezi streptokokem a enterokokem, ale je rezistentní na vankomycin**, což obvykle mikrobiologa „trkne“.
- Nejznámější **hemofily** jsou *H. influenzae* (druhé jméno? Často sekundární infekce při „chřipkovitých“ virózách), *H. parainfluenzae* a *H. aphrophilus*. Původcem měkkého vředu je *H. ducreyi*.



කොළඹ - මානව හිමිකම් කොමිෂන් ජනරජයේ මානව හිමිකම් කොමිෂන් ජනරජයේ

H

I

B

Příběh druhý



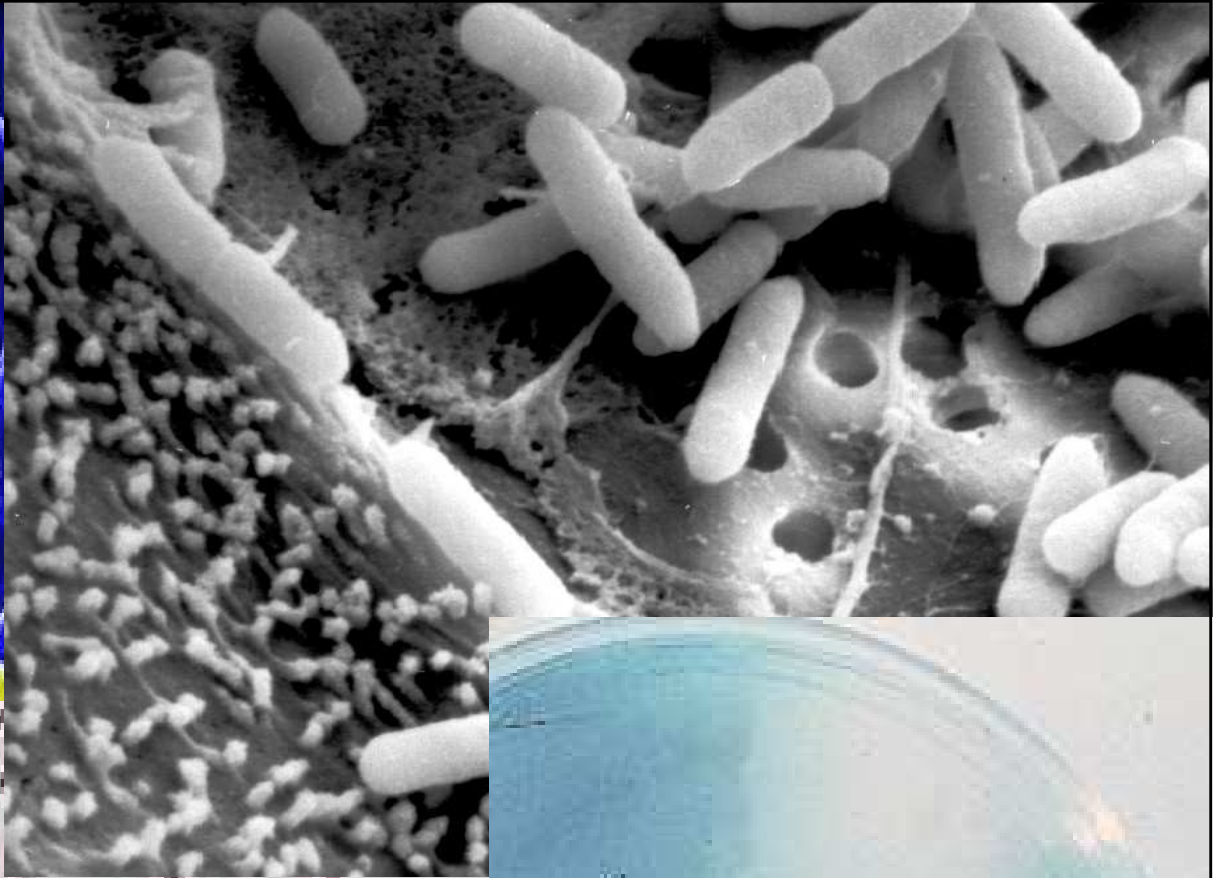
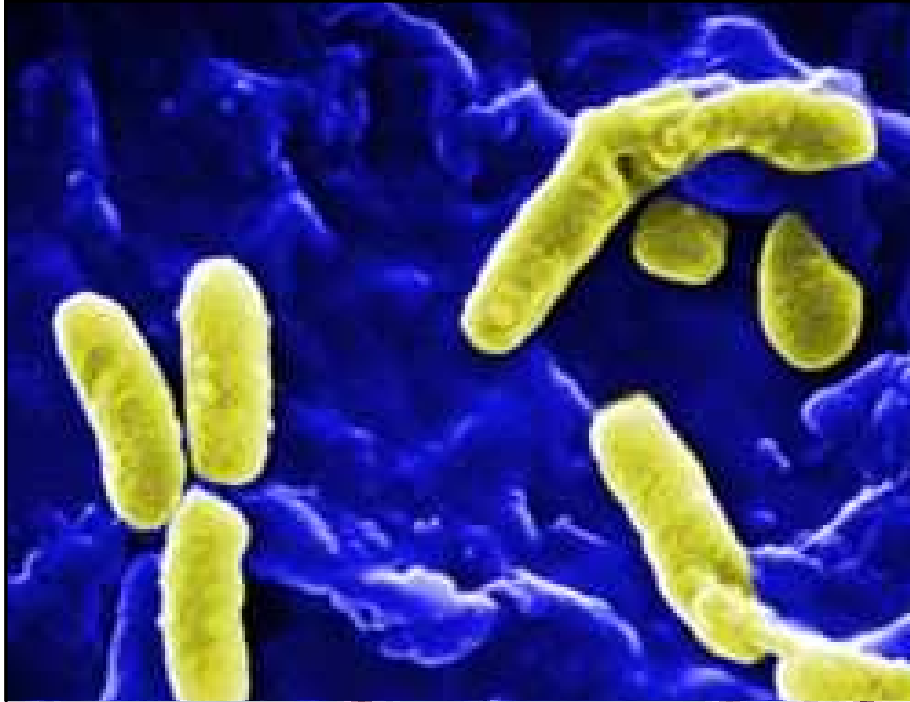
- **Pan Zápalka** je pyroman. Nedávno na svou vášeň doplatil a nehezky se popálil. Nyní se mu **popálenina zanítla**. Leží na popáleninovém centru a je na tom velice špatně. Lékaři naštěstí pochopili, že běžná antibiotika jsou mu platná jako mrtvému zimník a **provedli stěr**. Díky tomu se podařilo najít **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 baktérií
- Viníkem by stejně dobře mohla být i kterákoli jiná bakterie z této skupiny, např. *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia* nebo *Stenotrophomonas maltophilia*
- Obecně: Jsou to bakterie z vnějšího prostředí, často rostlinné patogeny, „bakterie-zbabělci“, které si netroufnou na zdravého člověka. Jejich terčem jsou pacienti s popáleninami, klienti ARK, JIP, transplantačních center a podobně.

U oslabených osob mohou způsobovat např. i zánět nehtového lůžka.





Výjimečný kmen
pseudomonády
s modrým
pigmentem

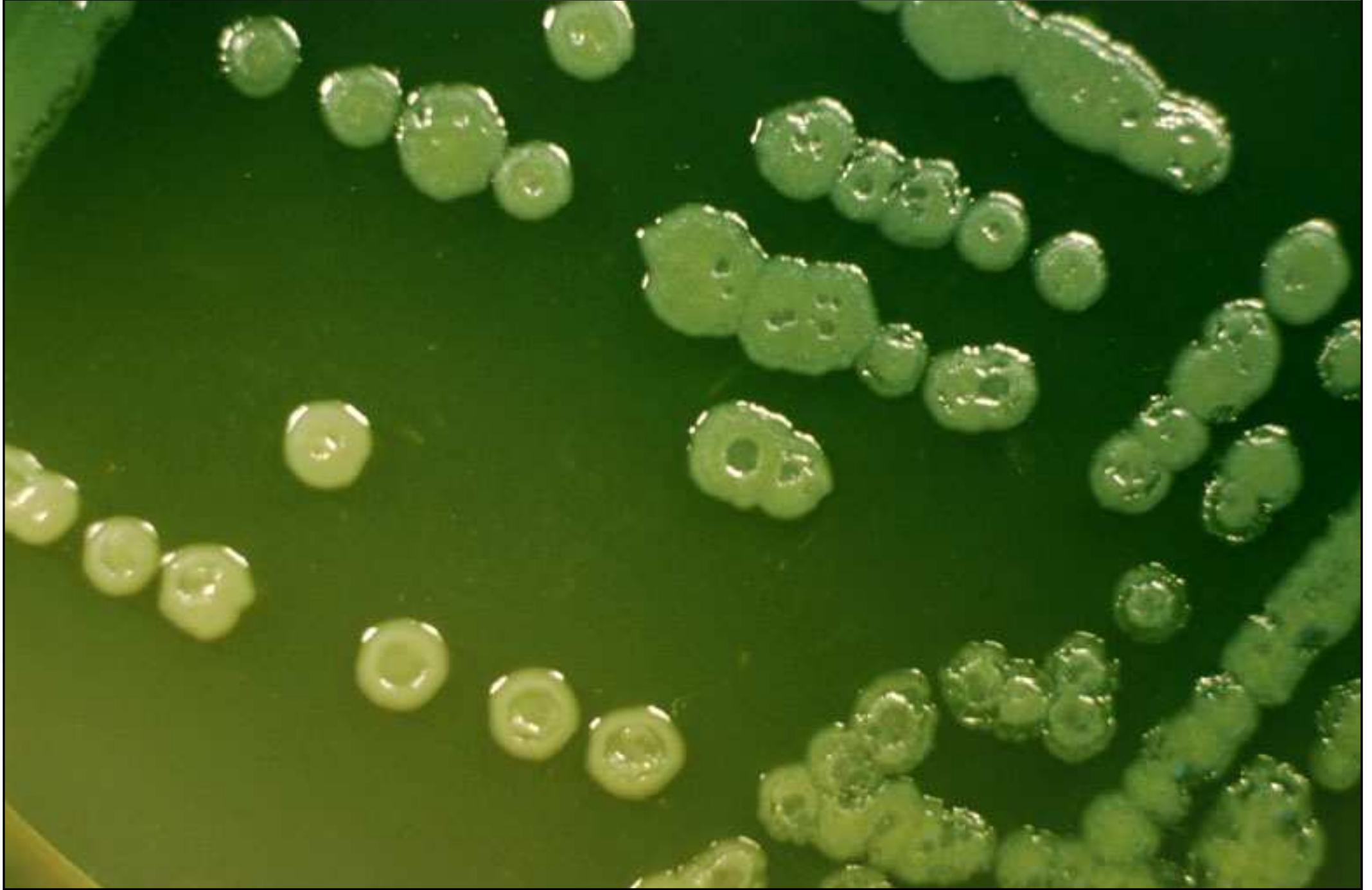
Jak se naučit některé názvy

- Zatímco některé bakteriální názvy se i chytrý student musí naučit z paměti, u některých si bystrouš může pomoci.
- Například *Burkholderia cepacia* způsobuje hnilobu cibule (*Allium cepa*), je to tedy opravdu klasický rostlinný patogen
- *Stenotrophomonas maltophilia* je zase vlastně zúžené-výživy-jednotka maltózu-milující, tedy taková panda mezi mikroby, která místo bambusu okusuje maltózu.

Toho logického je tu i víc!

- Jak víte, klinicky významné bakterie používají zpravidla jeden ze dvou typů metabolismu: fermentaci a aerobní respiraci.
- *Escherichia coli*, která má dost živin, ale málo kyslíku (i když jiných plynů si užije dost 😊) preferuje fermentaci glukózy i jiných cukrů.
- Naopak pseudomonády mají kyslíku habaděj, ale živin málo. Volí tedy aerobní respiraci, která jim umožní to málo dostupných živin využít úplně
- Adaptace na vnější prostředí se projevuje i pigmenty.

Pseudomonas aeruginosa na MH



Přehled lékařsky významných G - tyček

Hemofil



Příběh	Endo	Skupina
P04	roste	Enterobacteriaceae (GLC +, OXI -)
P04	roste	Vibrionaceae (GLC +, OXI +)
P04	ne	<i>Campylobacter</i> a <i>Helicobacter</i>
2.	roste	G- nefermentující bakterie (GLC -)
1.	ne	<i>Pasteurelanceae</i>
P06	ne	Další G- tyčinky, viz příští praktikum

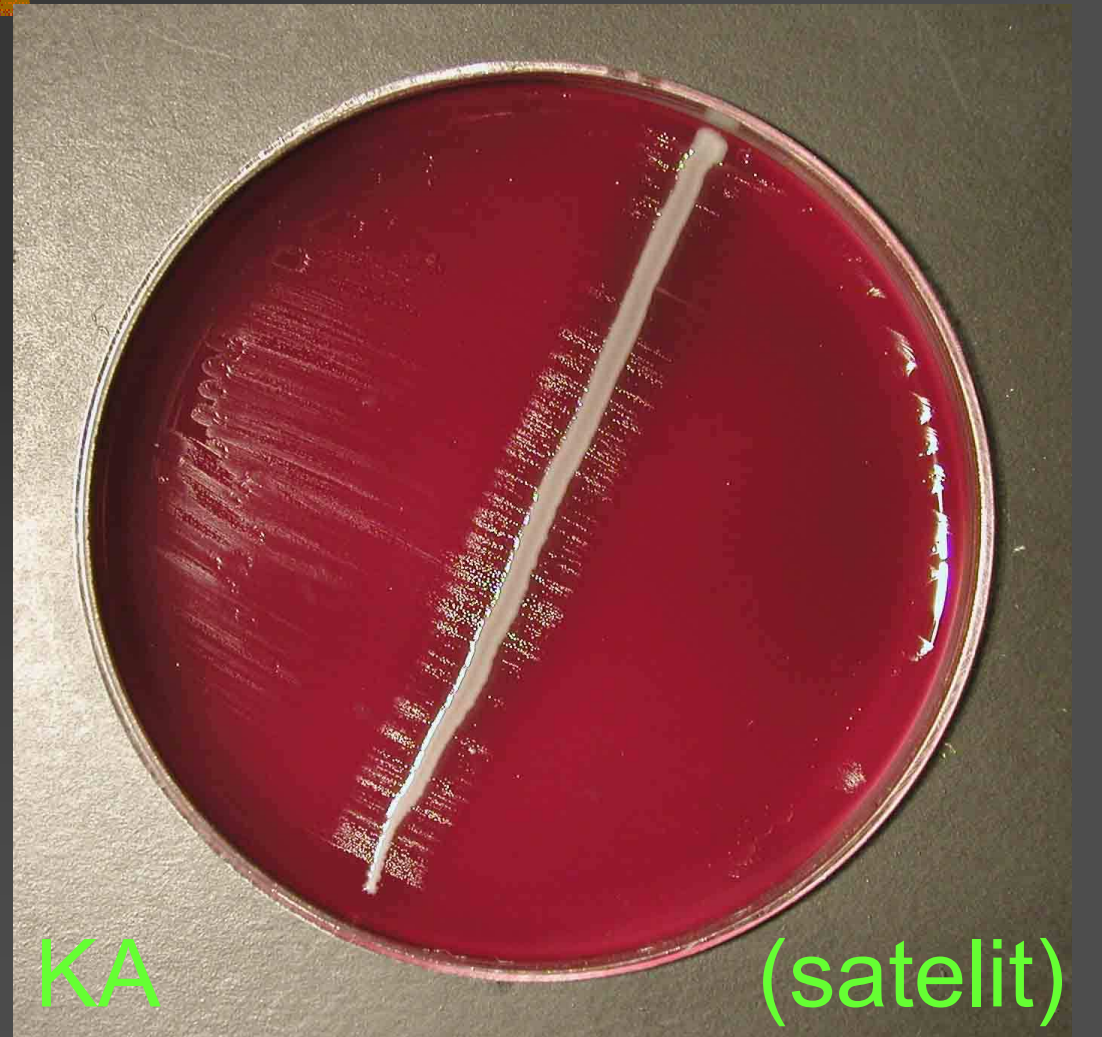
Přehled metod použitelných k dopadení dnes probíraných zločinců

■ Přímé metody

- **Mikroskopie** – pokud ji potřebujeme pro odlišení od bakterií jiné morfologie
- **Kultivace** – nefermentující rostou na většině půd, *Pasterurellaceae* jsou mnohem vybíravější
- **Biochemická identifikace** – u obou skupin; u nefermentujících je založena na reakcích aerobní respirace, vyžaduje ↓ teplotu a 2 dny kultivace
- **Antigenní analýza** – zejména u hemofilů (Hib)

Nepřímé metody se téměř nepoužívají

Fotografie z databáze zločinců 1: Hemofily



Fotografie z databáze zločinců 2

Pseudomonas aeruginosa



Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika)

- **Gramovo barvení** odliší gramnegativní tyčinky od ostatních bakterií
- **Endova půda:** jak již víme, rostou na ní z.klinicky významných jen **enterobaktérie**, příslušníci čeledi ***Vibrionaceae*** a **gramnegativní nefermentující tyčinky**
- **Nefermentující** odliší to, že nefermentují glukózu (např. Hajnova půjda zůstává po kultivaci celá červená, nezmění vůbec barvu)
- ***Pasteurellaceae*** mimo jiné prozradí zápach

K diagnostice hemofilů a pasteurel



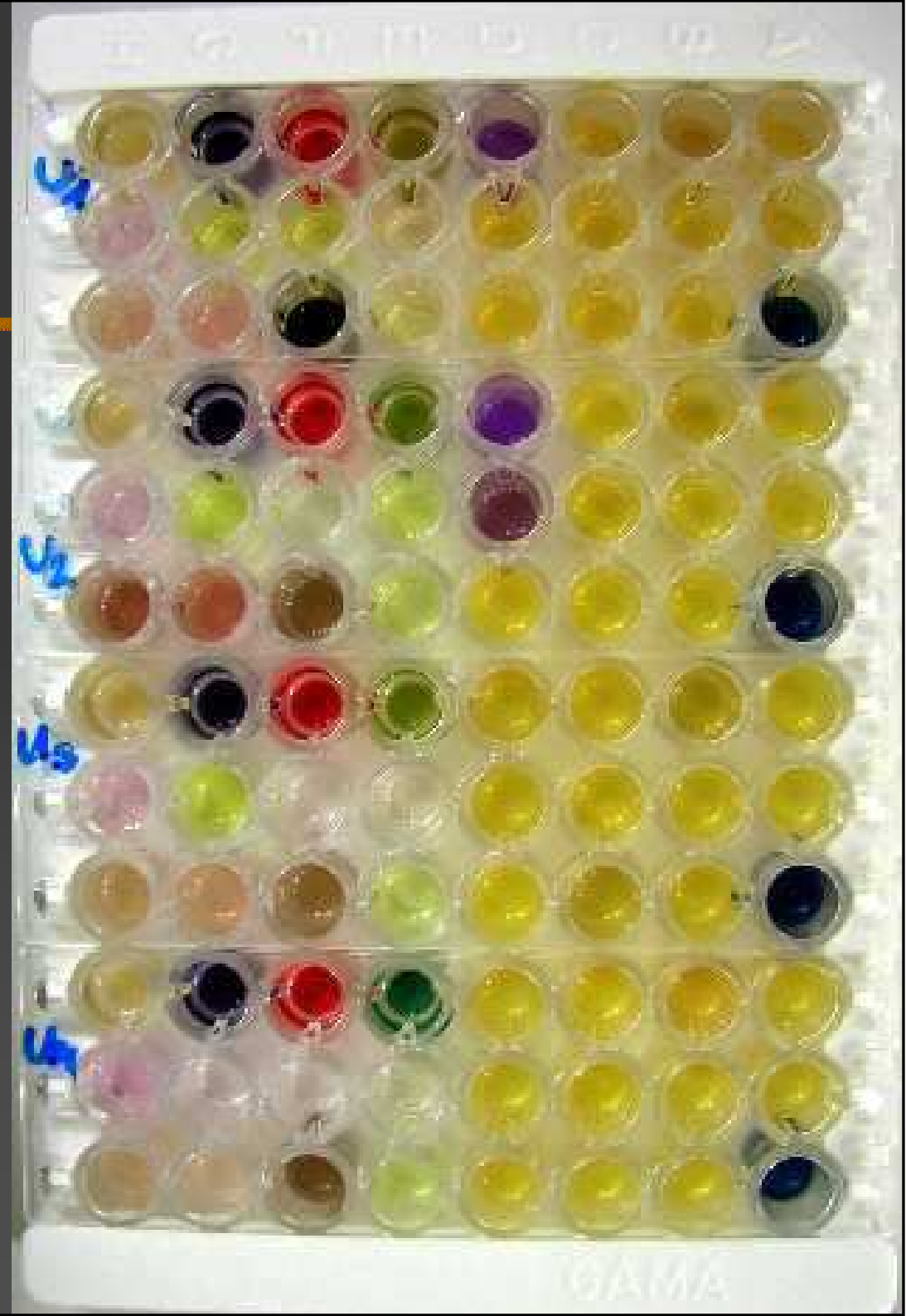
- **Pasteurely** rostou na krevním agaru
- **Hemofily** na krevním agaru růst neumějí, protože si neumějí „otevřít“ krvinku
- Rostou tedy na **čokoládovém agaru**
- Na KA rostou v přítomnosti takové bakterie, která jim krvinku „otevře“ (**satelitový fenomén**). Takovou bakterií je například zlatý stafylokok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

K diagnostice 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

NEFERMtest 24

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



Úkol 1: Defilé podezřelých (barvení kultur podle Grama)

- Obarvěte podle Grama čtyři podezřelé kmeny (pro zopakování: natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem, poté barvit: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní obj.)
- Rozlišíte bakterie podle tvaru a typu buněčné stěny. Pro vzájemné G- tyčinek musíte pokračovat dál.

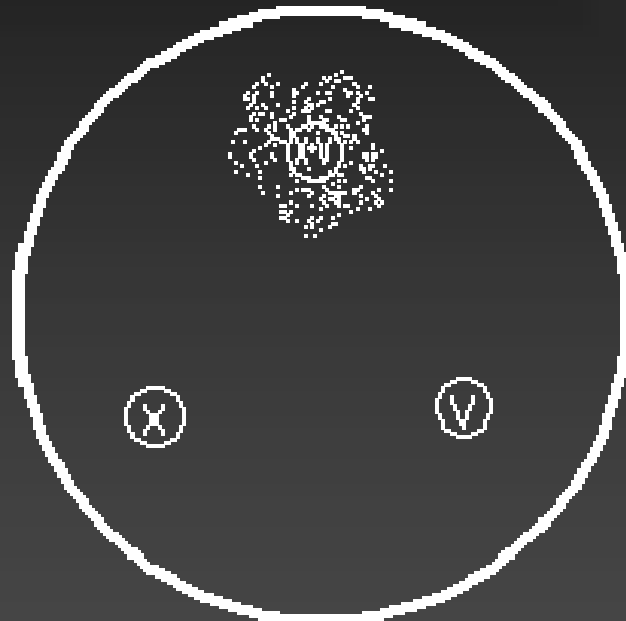
Úkol 2 Kultivace hemofilů

Úkol 3 Růstové faktory hemofilů

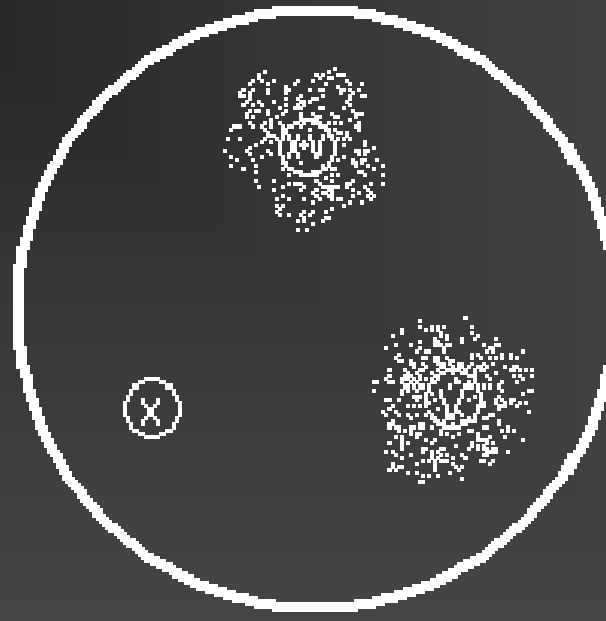
- Prohlédněte si výsledky kultivace hemofilů na čokoládovém a krevním agaru a popište morfologii kolonií. Všimněte si, že na krevním agaru roste hemofil pouze v okolí stafylokoka (satelitový fenomén)
- Ne všechny hemofily potřebují stejné faktory. *H. parainfluenzae* potřebuje faktor V (což je NAD), *H. aphrophilus* faktor X (což je hemin), *H. influenzae* potřebuje oba. Používáme disky napuštěné těmito faktory.

Test růstových faktorů hemofilů

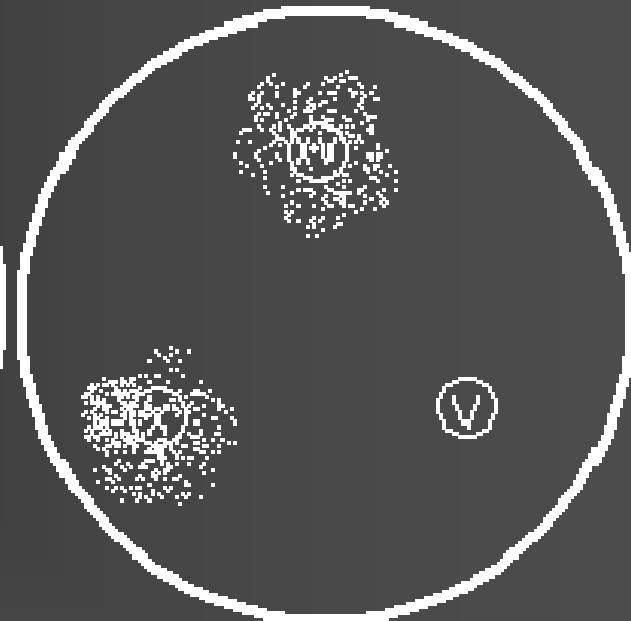
Jeden disk obsahuje faktor X, druhý faktor V, třetí směs obou



Haemophilus influenzae

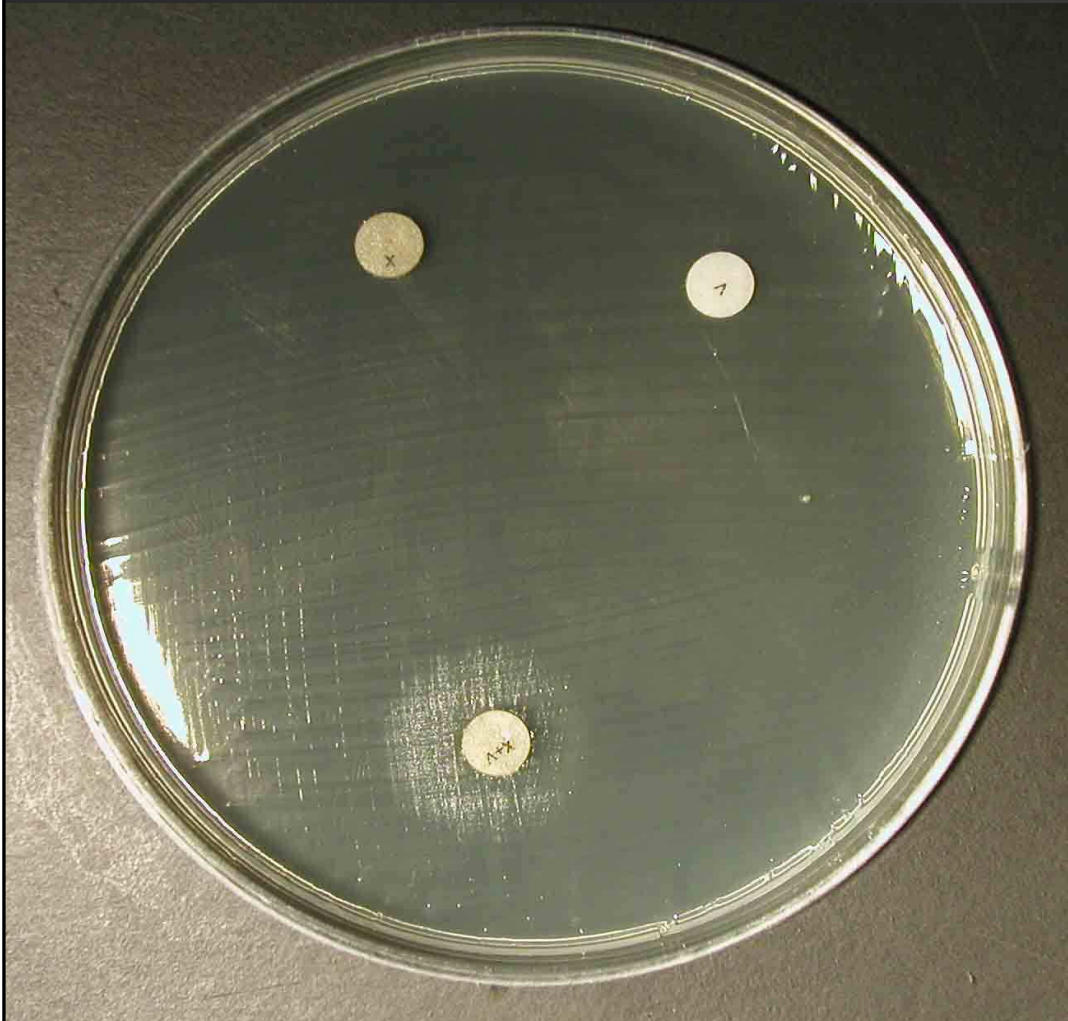


Haemophilus parainfluenzae

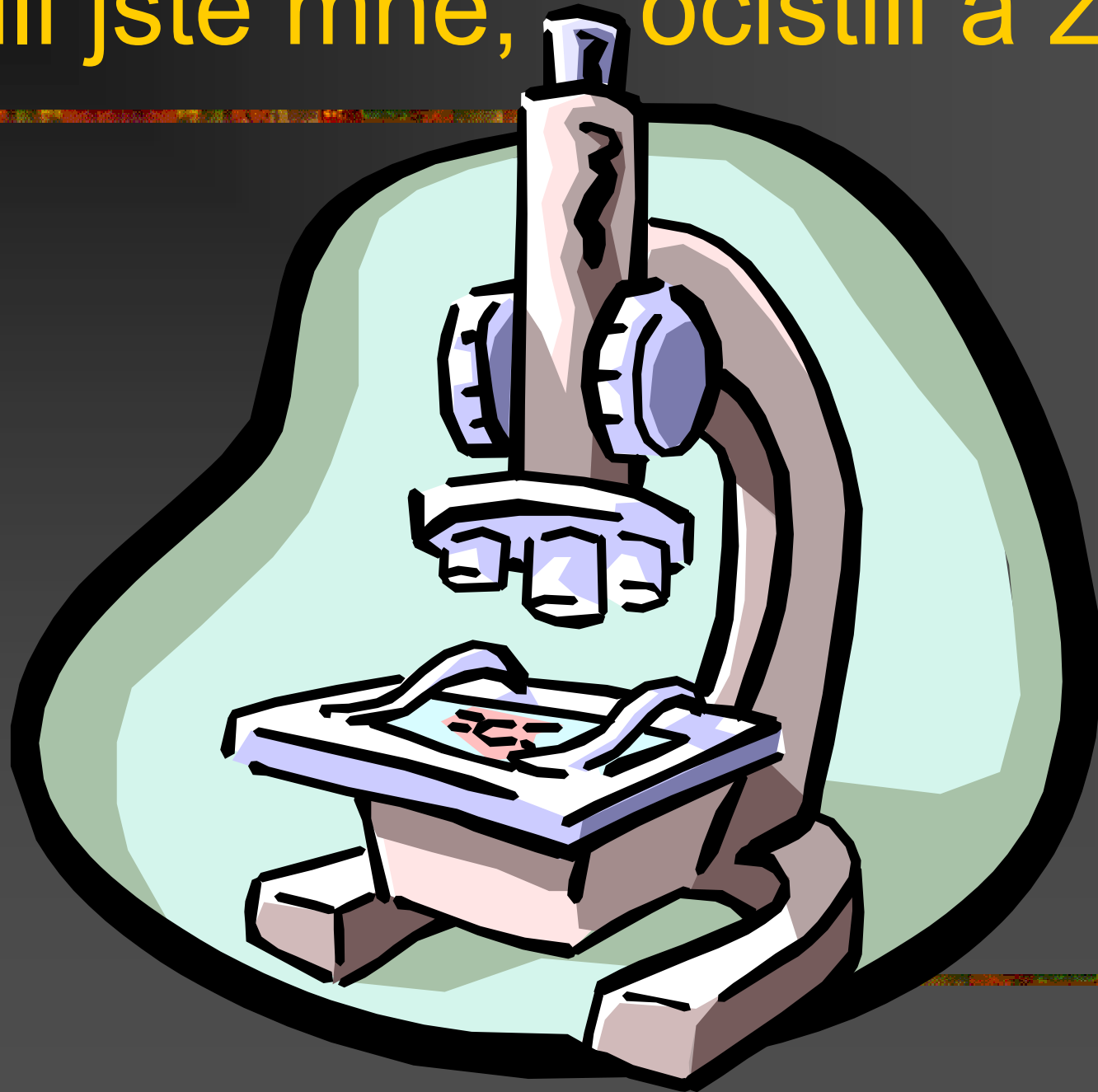


Haemophilus aphrophilus

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



Už mne nebudete potřebovat!
Vypnuli jste mne, očistili a zakryli?



Úkol 4 – antigenní analýza

- 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
- Prohlédněte si video

Úkol 5 – 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
- Případnou **diskovou rezistenci k ampicilinu** je třeba ověřit testem produkce **betalaktamázy**

Upozornění

- Hemofily tvoří velmi mrňavé kolonie. Pokud je očkujeme nahusto (jako při testování citlivosti na antibiotika), jsou ještě mrňavější.
 - Proto je na agaru není moc vidět. Je třeba najít vhodné úhly mezi vaším okem, miskou s hemofilem a dopadajícím světlem – zprvu se zdá, že tam nic není!
-

Tabulka zón citlivosti – HEM

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Ampicilin (aminopenicilin)	AMP	22 mm
Ko-amoxicilin (am.+inhib.)	AMC	20 mm
Chloramfenikol	C	20 mm
Doxycyklin (tetracyklin)	DO	29 mm
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	26 mm
Azithromycin (makrolid)	AZM	26 mm

Úkoly 6 a b c d: Dg. pseudomonád

- V úkolu 6 a) c) d) provedete testy sloužící k diagnostice pseudomonád, dle protokolu
 - 6 a Popište kolonie na KA, Endově agaru a MH. Nezapomeňte je očichat. *Při přirovnávání se fantazii meze nekladou (jasmín? jahody? plastelína?)*
 - 6 c Zaznamenejte růst na půdě dle Hajny
 - 6 d Proveďte oxidázový test
- V úkolu 6 b) si ozřejmíte, že pseudomonáda je striktně aerobní bakterie, nikoli fakultativně anaerobní jako například *Escherichia coli*



Úkol 7 – testy antibiotické citlivosti

- Na rozdíl od hemofilů rostou pseudomonády na nejrůznějších půdách včetně MH
- Bude se vám možná znát, že „přece ty pseudomonády nejsou tak hrozně rezistentní, jak nám ti hloupí asistenti říkají“. Jenže – citlivé jsou tehdy, když použijeme sestavu speciálních protipseudomonádových antibiotik, a i to jenom někdy.
- Všimněte si, že pseudomonáda díky tvorbě pigmentu zpravidla **barví MH agar na zeleno**

Tabulka zón citlivosti – PS 1

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Piperacilin + tazobaktam	TZP	18 mm
Gentamicin (aminoglykos.)	CN	15 mm
Ofloxacin (chinolon 3 gen)	OFL	16 mm
Ciprofloxacin (chin 3 gen)	CIP	21 mm
Ceftazidim (CS 3 gen)	RD	18 mm
Cefoperazon	CFP	21 mm
Colistin	CT	10 mm

Tabulka zón citlivosti – PS 2

Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Amikacin (aminoglykosid)	AK	17 mm
Cefoperazon + sulbaktam	SCF	21 mm
Aztreonam (monobaktam)	ATM	22 mm
Cefepim (cefalosp. 4 gen)	FEP	18 mm
Imipenem (karbapenem)	IPM	16 mm
Meropenem (karbapenem)	MEM	16 mm

Šlo by to i E-testem





Než opustíte
praktikárnu...

...pláště laskavě nepohazujte po
praktikárně, nýbrž je pověste na
věšák tak, aby nespadly.

Nashledanou při dalším dílu!

Použity obrázky z adres:

1 2 www2.mf.uni-lj.si/~mil/bakt2/bakt2.htm

3 www.kvarts.is/photo.htm.

4 <http://de.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas>

5 - 7 textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html.

8 www.uiowa.edu/~image/iaf/images/microscopy.html

9

<http://faculty.plattsburgh.edu/jose.deondarza/Bio406/Handouts/cases2.htm>

totéž - 01 Spirochety, 97 a 98 Enterobakterie aj.

10 www.immune.org.nz/?t=640.

11 <http://www.uni->

[ulm.de/klinik/imi/mikrobio_2002/krankenversorgung/Diagnostik/Images/Erreger/HaemophilusInfluenzae.jpg](http://www.uni-ulm.de/klinik/imi/mikrobio_2002/krankenversorgung/Diagnostik/Images/Erreger/HaemophilusInfluenzae.jpg)

12

<http://www.tufts.edu/sackler/immunology/images/Haemophilus%2520on%2520adenoidal%2520tissue.jpg>

14 <http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/images/d7128.jpg>

15 <http://www.kinderaerzte-im-netz.de>

O pseudomonádách se, jak vidíte, pořádají i celé konference.

