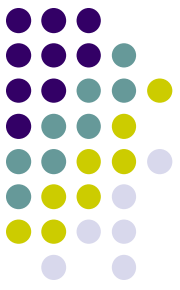

GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE II.





- Které jsou klinicky významné G+ koky?

Stafylokoky, streptokoky, enterokoky

- A které klinicky významné G+ tyčinky?

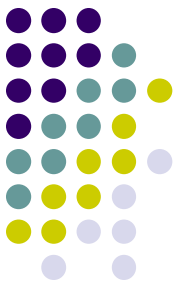
Např. listerie, koryneformní tyčinky, bacily

- A obligátně patogenní enterobakterie?

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

- A nějaké potenciálně patogenní?

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



- Je rozdíl mezi enterokokem a enterobakterií?

Enterokok je G + kok, enterobakterie, včetně rodu *Enterobacter*, jsou gramnegativní tyčinky. Ovšem, všechny mají nějaký vztah ke střevu obratlovců.

- Které bakterie rostou na Endově půdě?

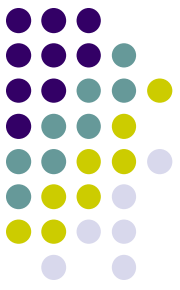
Enterobakterie, *Vibrionaceae*, G- nefermentující

- 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.)



- 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.

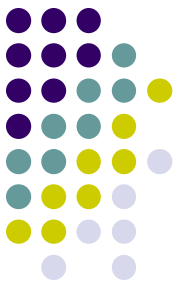
- Které další půdy se používají u enterobakterií?

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

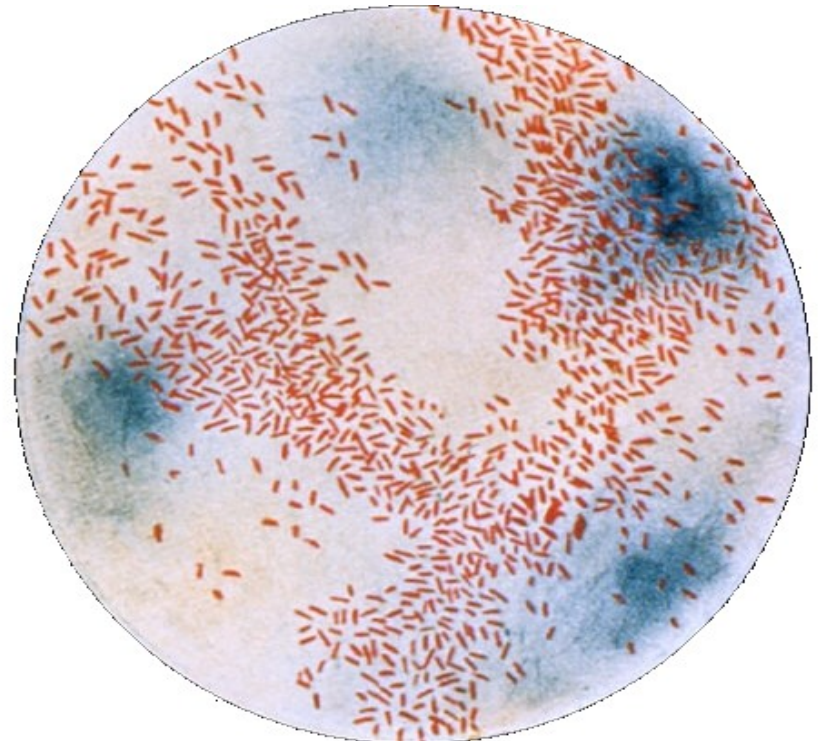
- Jak odlišíme EPEC? A jak S. Enteritidis?

V obou případech antigenní analýzou na skle.

Rod *Haemophilus*



- Hemofily jsou krátké G- tyčinky, patří do čeledi *Pasteurellaceae*
- V mikroskopu- od malých kokobacilů po dlouhé tyčky
- Nerostou na ENDU, dokonce ani na KA, protože nejsou schopni získat z krvinek růstové faktory, které potřebují.



Klasifikace hemofilů



- *Haemophilus influenzae*
 - pouzderný typ b (Hib)
 - pouzderné typy a, c, d, e, f
 - neopouzdržené kmeny
- *Haemophilus parainfluenzae* (mnohem běžnější a mnohem méně patogenní), *Haemophilus aphrophilus* a mnoho dalších druhů
- *Haemophilus ducreyi*, původce pohlavně přenášené choroby **ulcus molle**
- Velmi běžná je **přítomnost hemofilů v krku**, přičemž patogenní role je velmi pochybná. Zvláště v případě *Haemophilus parainfluenzae* nepředpokládáme, že by byl patogenem.

Haemophilus influenzae



- Dlouho považován za původce chřipky.
- Virulentní kmeny mají polysacharidové pouzdro (a až f), nejčastěji typ b (Hib).
- Nejzávažnější choroby jsou invazivní infekce u předškolních dětí - **epiglottitida, meningitida, pneumonie a sepse.**
- Další časté choroby jsou **otitis media a sinutisitida.**
- Od r. 2001 očkování dětí

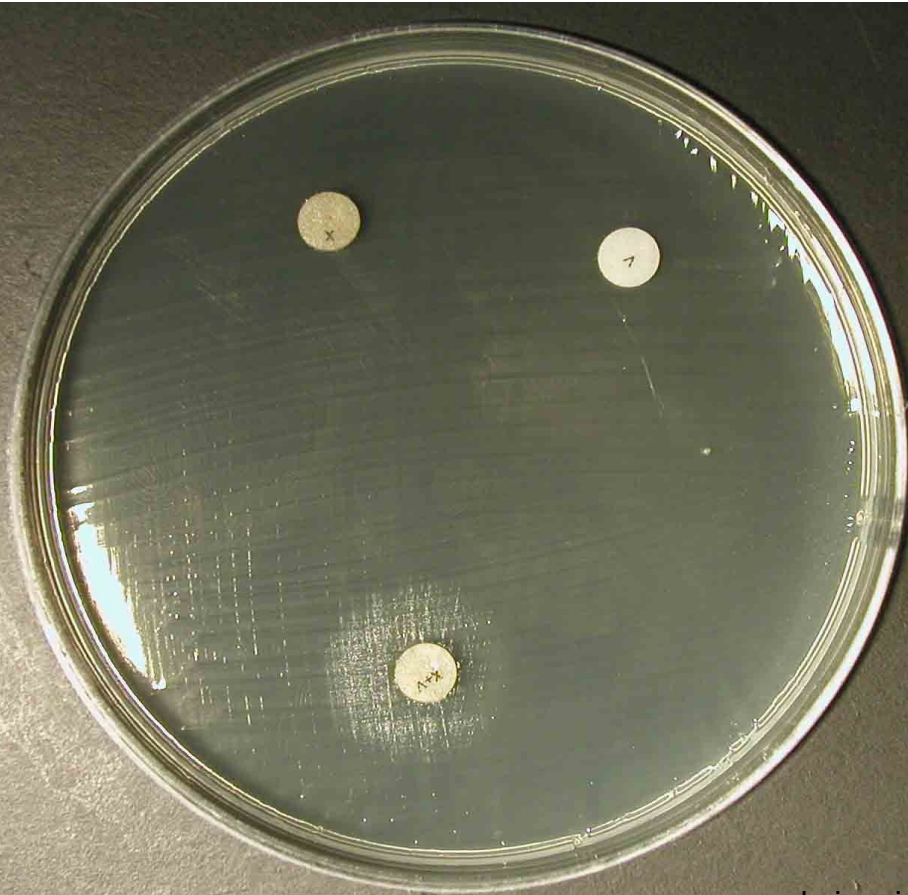
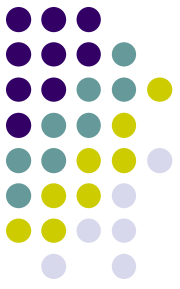




Růstové faktory hemofilů

- Hemofily vyžadují faktory z krvinek, avšak jejich potřeba konkrétních faktorů je specifická:
 - *H. parainfluenzae* vyžaduje faktor V (= NAD)
 - *H. aphrophilus* vyžaduje faktor X (= hemin)
 - *H. influenzae* vyžaduje oba faktory.

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



Pasteurella multocida



- *Pasteurella multocida* je běžnou flórou v dýchacích cestách psovitých a kočkovitých šelem.
- U člověka způsobuje zejména zhnisání ran po pokousání psem či jiným zvířetem.
- Má podobný **charakteristický pach, podobný hemofilovému**, ale na rozdíl od něj roste na krevním agaru (nikoli však na Endově půdě)
- Vypadá tam jako něco mezi streptokokem a enterokokem, ale je rezistentní na vankomycin, což obvykle mikrobiologa „trkne“.

Gramnegativní nefermentující bakterie

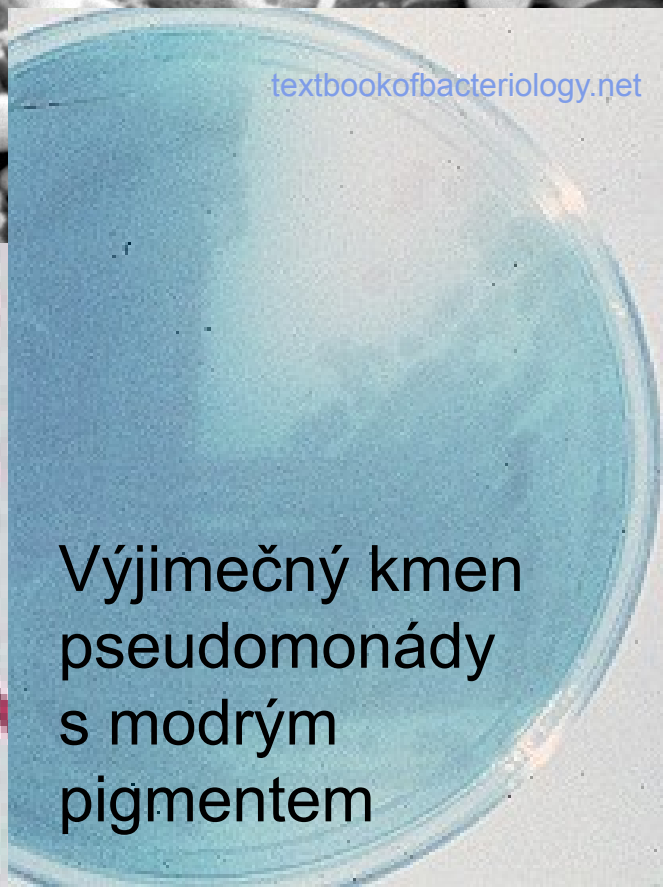
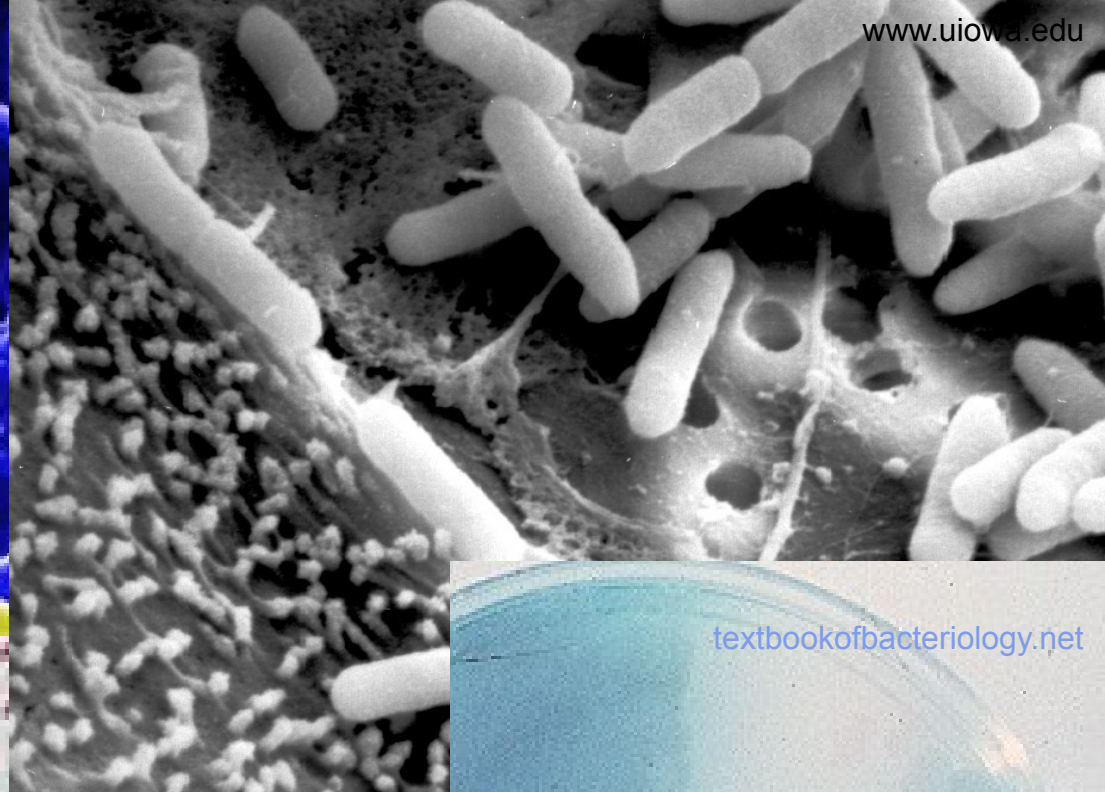
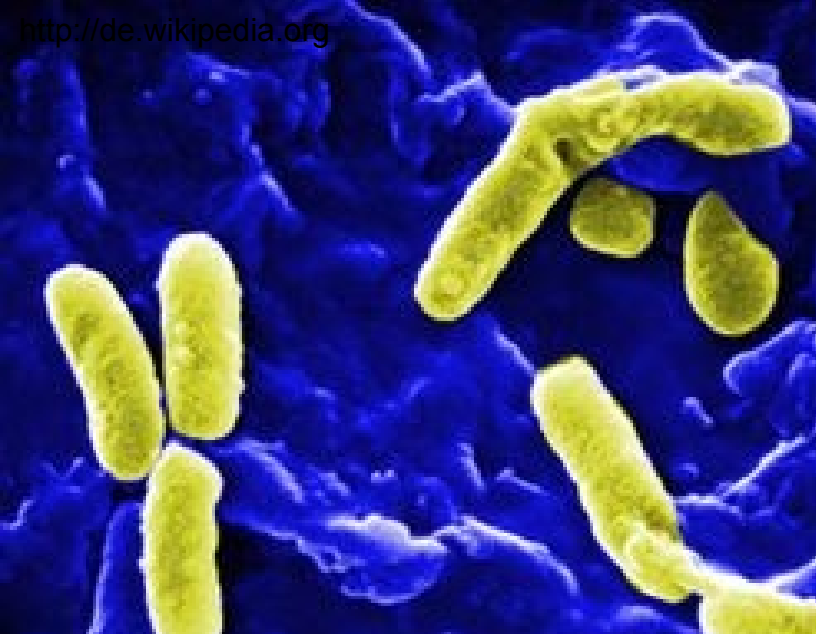


- Nejběžnější bakterie ze skupiny gramnegativních nefermentujících baktérií je ***Pseudomonas aeruginosa***
- Mezi další patří např. rody ***Acinetobacter***, ***Burkholderia*** nebo ***Stenotrophomonas***
- Striktně aerobní bakterie
- Obecně: Jsou to bakterie z vnějšího prostředí (saprofyté), často rostlinné patogeny, „bakterie-zbabělci“, které si netroufnou na zdravého člověka. Jejich terčem jsou pacienti s popáleninami, klienti ARK, JIP, transplantačních center a podobně

Pseudomonas aeruginosa



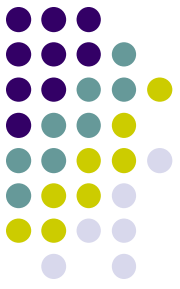
- Rod *Pseudomonas* zahrnuje desítky druhů
- G- rovná tyčinka
- Charakteristický zápach (jasmín) a barva (**zelený pigment**)
- Vyskytuje se v odpadní vodě, střevě obratlovců, na rostlinách a v půdě
- Významný původce nozokomiálních nákaz, kolonizuje vlhká místa pacienta (uši, podpaží,..)
- Infekce **popálenin**, těžké operativní výkony, katétry, maligní procesy, **cystická fibróza** atd.



textbookofbacteriology.net

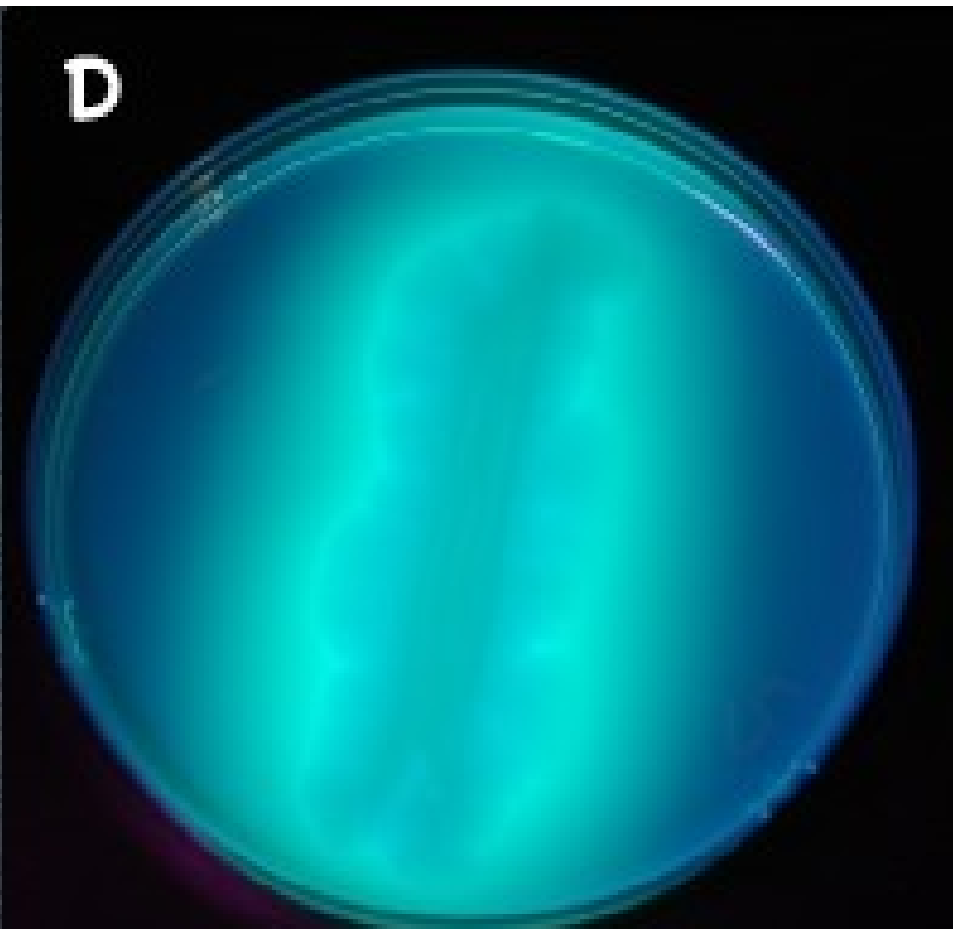
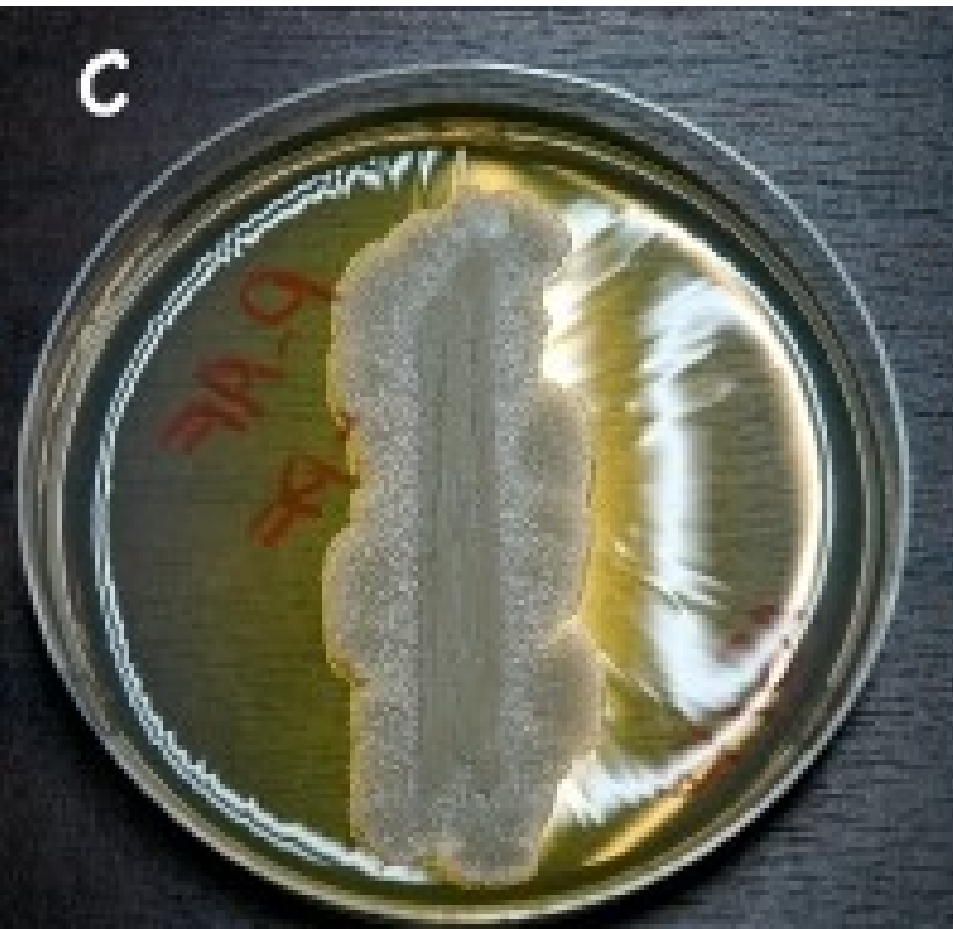
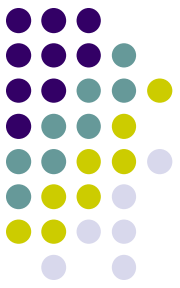
Výjimečný kmen
pseudomonády
s modrým
pigmentem

Nefermentující a cystická fibróza



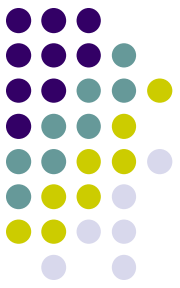
- Cystická fibróza je těžké, **vrozené onemocnění plic** s poruchou produkce normálního plicního surfaktantu. To vede ke změně charakteristikám plic, včetně mnohonásobně zvýšeného rizika infekce
- **Nejčastějšími původci** jsou:
 - Pseudomonas aeruginosa*
 - Burkholderia cepacia*
 - Staphylococcus aureus*Kmeny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

Další „nefermentující“: *Pseudomonas fluorescens*

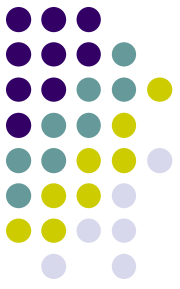


Burkholderia cepacia

Burkholderia cepacia způsobuje hnilobu cibule (*Allium cepa*), je to tedy typický rostlinný patogen
Nozokomiální infekce dýchacích cest



Burkholderia pseudomallei

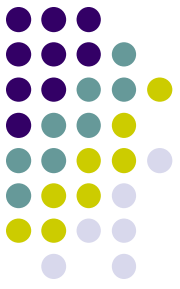


- *Burkholderia pseudomallei* je původcem těžkého onemocnění-**melioidózy**
- Příbuzná *B. mallei* způsobuje zoonózu zvanou malleus čili vozňřivka

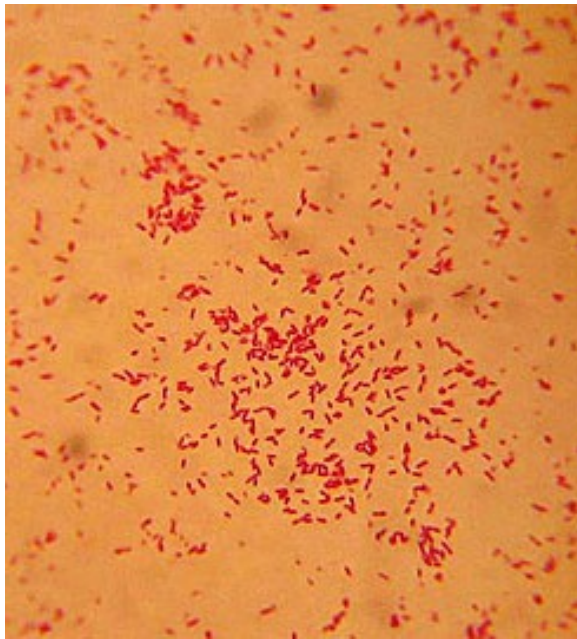
Nebezpečné i pro člověka



Stenotrophomonas maltophilia

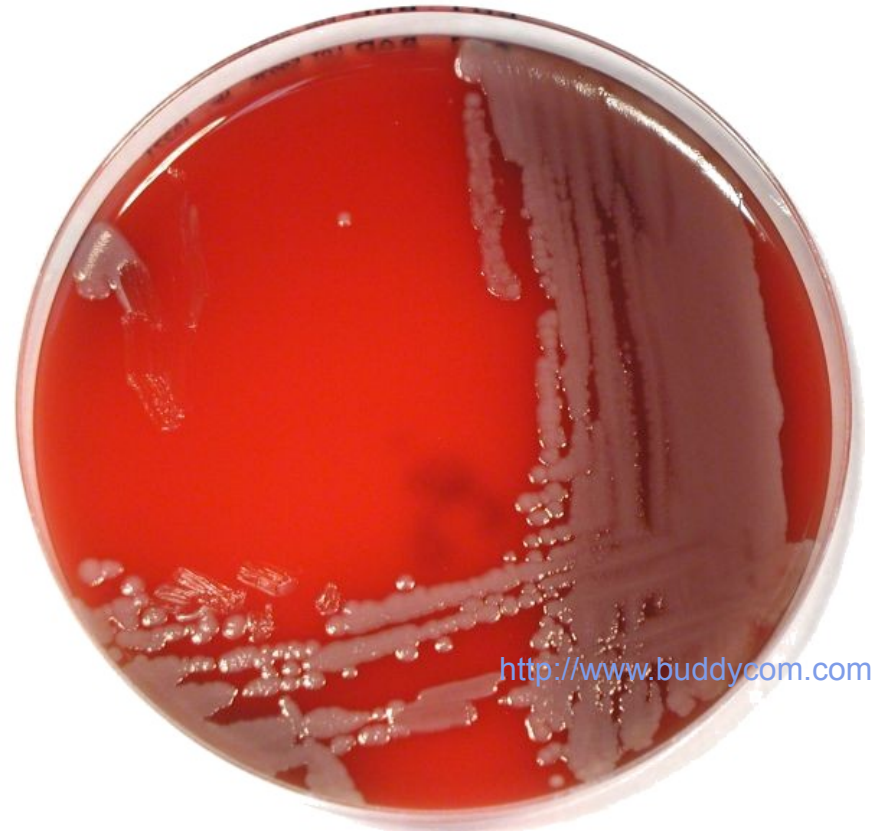
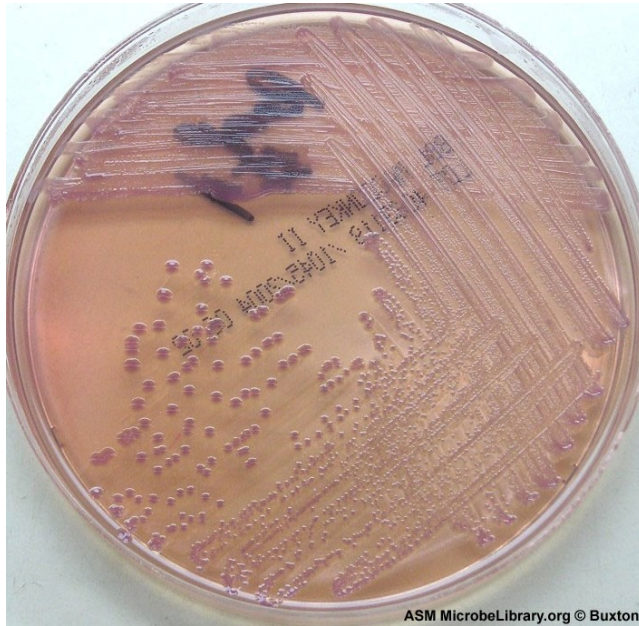
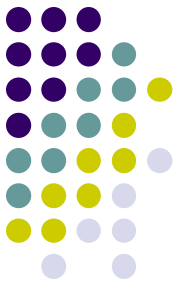


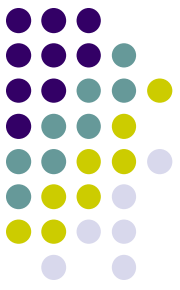
Původci respiračních infekcí, ranné infekce, infekce močových cest



Acinetobacter sp.

Z řečtiny: *a-kineto-* = „nepohyblivý“





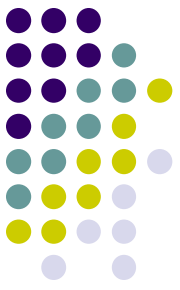
Přehled metod

- **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

Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika)

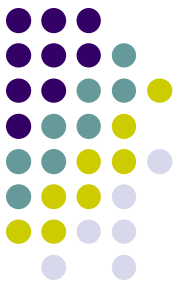


- Gramovo barvení odliší gramnegativní tyčinky od ostatních bakterií
- Endova půda: jak již víme, rostou na ní z klinicky významných jen *enterobakterie*, příslušníci čeledi *Vibrionaceae* a gramnegativní nefermentující tyčinky
- Nefermentující odliší to, že nefermentují glukózu (např. Hajnova půda zůstává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

Diagnostika hemofilů a pasteurel

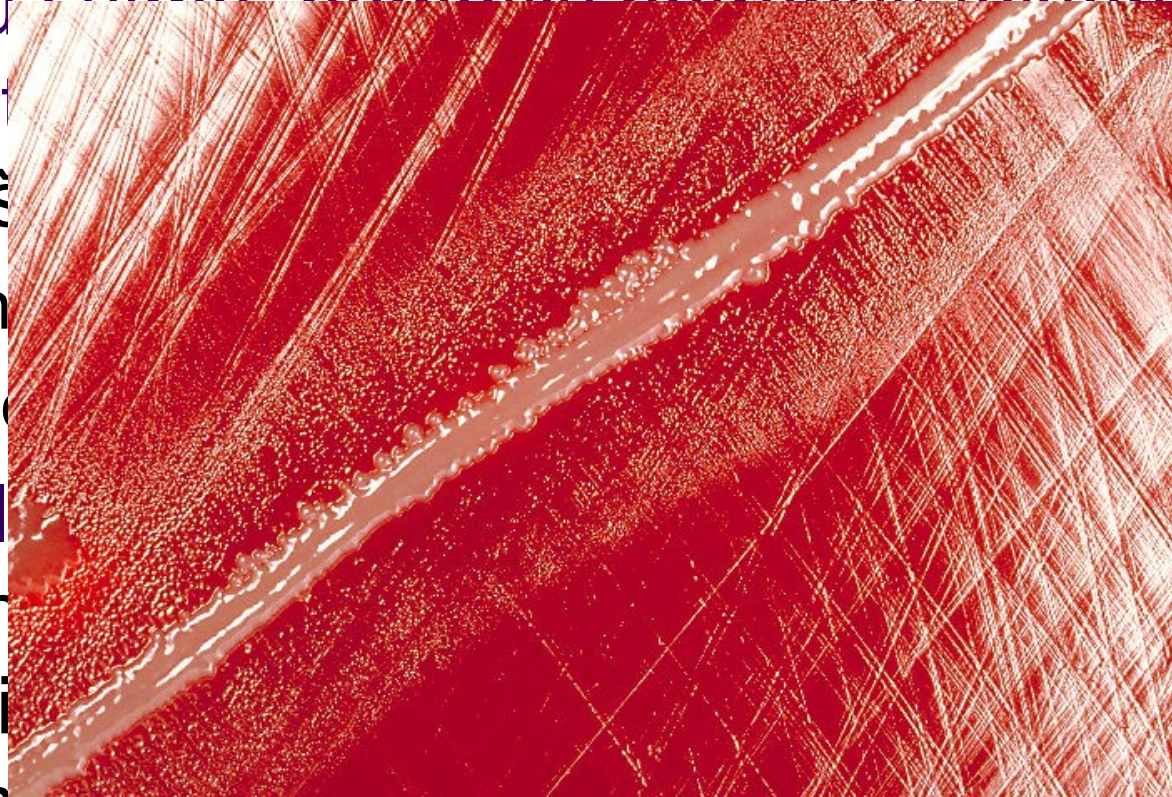


- Pasteurely rostou na krevním agaru
- Hemofily na krevním agaru růst neumí, rostou na čokoládovém agaru
- Na KA rostou v přítomnosti takové bakterie, která jim krvinku „otevře“ (satelitový fenomén). Takovou bakterií je například zlatý stafylokok
- Mají **droboučké kolonie**, proto se používá disk k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



Satelitový fenomén

- Jak už víme, hemofily potřebují faktory z erytrocytů, které mohou být narušeny:
 - zahříváním
 - přítokem kyslíku
- Satelitní bakterie mohou být přeneseny z krve do kloubů, zejména do kolenní staphylokokové čáry.



Detekce hemofilů

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



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

Úkol 1: Barvení kultur podle Grama



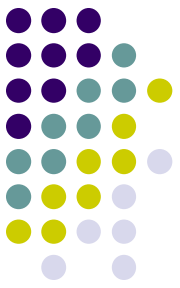
- Obarvěte podle Grama podezřelé kmeny (pro zopakování: natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem, poté barvit: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní obj.)
- Rozlišíte bakterie podle tvaru a typu buněčné stěny. Pro vzájemné G- tyčinek musíte pokračovat dál.

Úkol 2: Kultivace bakterií



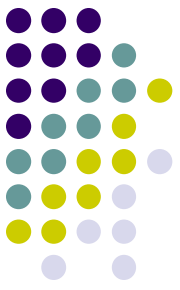
- Podívejte se na výsledky kultivace našich bakterií na čokoládovém agaru, krevním agaru, Endově a MH půdě. Popište morfologii kolonií na krevním agaru. U bakterií, které na krevním agaru nerostou, popište kolonie na čokoládovém agaru.
- **Hemofily** potřebují faktory z erytrocytů, ale nejsou samy schopny je narušit. Musíme je tedy narušit, například zahřátím (čokoládový agar)
- **Pasteurely** na krevním agaru rostou, na Endu však nikoli
- **G– nefermentující** naopak rostou na všech půdách

Pseudomonády na MH agaru a ostatních půdách



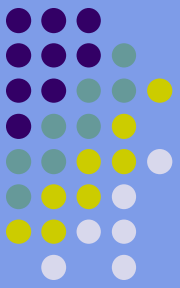
- Uvědomte si, že MH agar je sám o sobě téměř bezbarvý, resp. lehce nažloutlý.
- **Vše zelené, co vidíte na agaru, je výtvořem pseudomonády, resp. jejího pigmentu pyoverdinu**
- Na KA a Endu se tvorba pigmentu projevuje méně, ale projeví se také. Na těchto půdách je zato typický perleťový lesk kolonií.

Úkol 3a: Satelitový fenomén

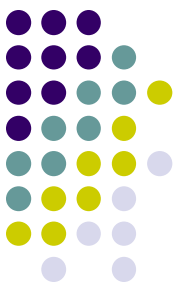


- Jak už víme, satelitový fenomén znamená růst hemofila pouze kolem stafylokokové čáry.
- Přítomnost satelitového fenoménu je důkazem, že jde opravdu o příslušníka rodu *Haemophilus*
- Kolonie jsou mrňavé, prohlížejte je důkladně!

Úkol 3b: Test růstových faktorů hemofilů



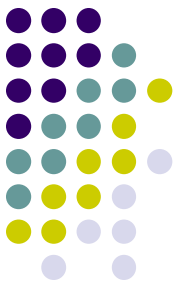
Jeden disk obsahuje faktor X, druhý faktor V, třetí směs obou



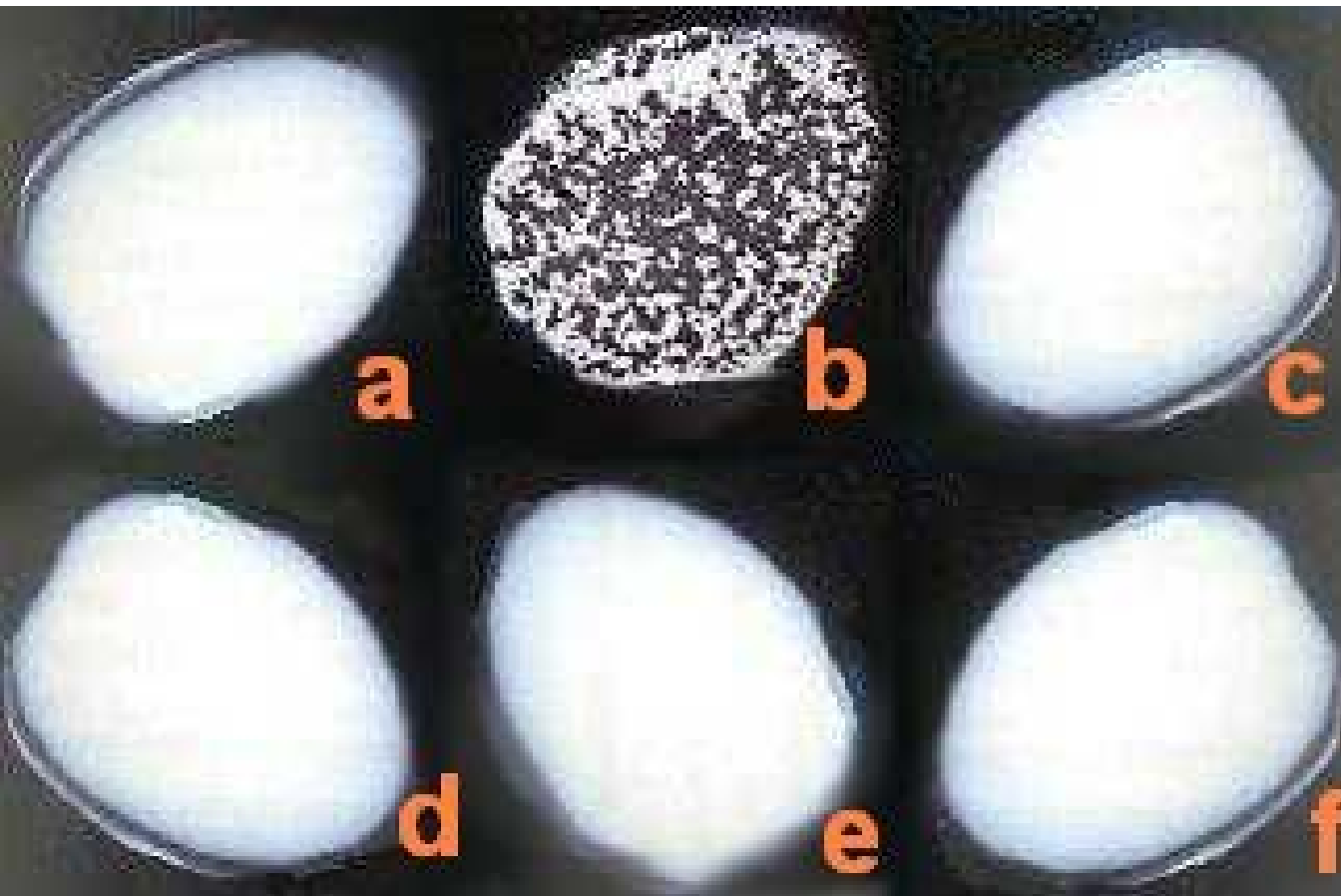
Úkol 3c – antigenní analýza

- 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 stafylokoků na Fc konec protilátky proti hemofilovi

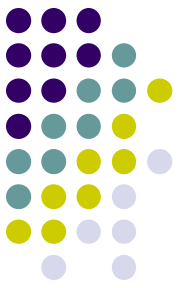
Úkol 3c – antigenní analýza – demonstrace výsledku



- Zapište výsledek aglutinace hemofilů dle obrázku (jde o kmen K):

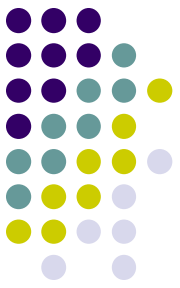


Úkol 3d: detekce *Pasteurella* typickým vzorcem citlivosti



- **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*.**

Úkol 4: Hajnova půda pro detekci G– nefermentujících bakterií

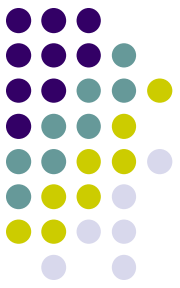


- Čtyři z našich kmenů **rostly na Endově agaru (vizte Úkol 2). Mohly by to být G– nefermentující, *Enterobacteriaceae* či *Vibrionaceae*.**
- Typické pro G– nefermentující je **chybění jakékoli změny na Hajnově půdě** (zůstává červená, případná nahnědlá barva nevadí, je dána přítomností pigmentů)
- Zapište výsledek do tabulky

Úkoly 5a: Oxidázový test

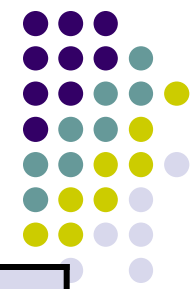


- Proveďte **oxidázový test** (pro připomenutí: reakční ploška se přiloží na kolonie, pozitivita = modré zbarvení)
- Z nejběžnějších G– nefermentujících tyčinek má *Pseudomonas* oxidázu pozitivní, *Burkholderia* zpravidla také; *Stenotrophomonas* většinou ne a *Acinetobacter* také nikoli.



Úkol 5b: 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 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 – kmen Q

(1 223 777 = *Burkholderia cepacia*, 100,00 %, $T_{in}=1,00$)

OX			H	G	F	E	D	C	B	A	
+	1	+	●	●	●	●	●	●	●	●	
		-	●	●	●	●	●	●	●	●	
		?	●	●	●	●	●	●	●	●	
			-	-	+	+	+	+	+	+	
	2	+	●	●	●	●	●	●	●	●	●
		-	●	●	●	●	●	●	●	●	●
		?	●	●	●	●	●	●	●	●	●
			+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	●	●	●	●	●	●	●	●	●
		-	●	●	●	●	●	●	●	●	●
		?	●	●	●	●	●	●	●	●	●
			-	-	-	+	+	+	+	+	
	1			2	2	3	7	7	7		

NEFERMtest 24 – kmen S

(0 226 504 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 100,00 %, $T_{in}=1,00$)

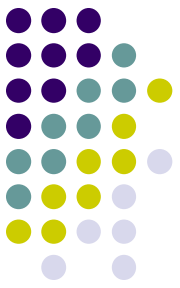


OX			H	G	F	E	D	C	B	A	
-	1	+	●	●	●	●	●	●	●	●	
		-	●	●	●	●	●	●	●	●	
		?	●	●	●	●	●	●	●	●	
			-	-	-	+	-	-	-	-	
	2	+	●	●	●	●	●	●	●	●	●
		-	●	●	●	●	●	●	●	●	●
		?	●	●	●	●	●	●	●	●	●
			+	+	+	-	-	-	-	-	
	4	+	●	●	●	●	●	●	●	●	●
		-	●	●	●	●	●	●	●	●	●
		?	●	●	●	●	●	●	●	●	●
			-	-	+	+	-	+	-	+	
0			2	2	6	5	0	4			

Úkol 6 – testy antibiotické citlivosti



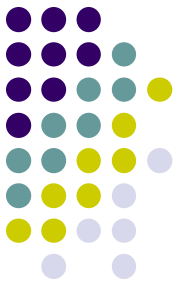
- Hemofily nerostou na MH agaru
- Zpravidla se používá Levinthalův agar (přefiltrovaný čokoládový agar), na kterém jsou zóny lépe viditelné než na klasickém čokoládovém agaru
- V naší laboratoři se používá „hemofilový agar“, což je půda blízká agaru Levinthalovu
- G– nefermentující naopak rostou ochotně na nejrůznějších médiích



Upozornění

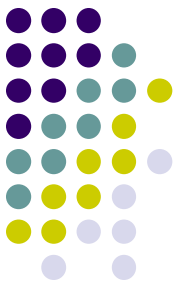
- Hemofily tvoří velmi mrňavé kolonie. Pokud je očkujeme nahusto (jako při testování citlivosti na antibiotika), jsou ještě mrňavější.
- Proto je na agaru není moc vidět. Je třeba najít vhodné úhly mezi vaším okem, miskou s hemofilem a dopadajícím světlem – zprvu se zdá, že tam nic není!

Tabulka zón citlivosti – HEM

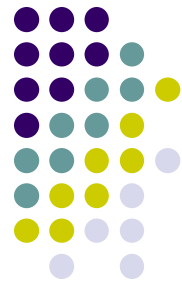
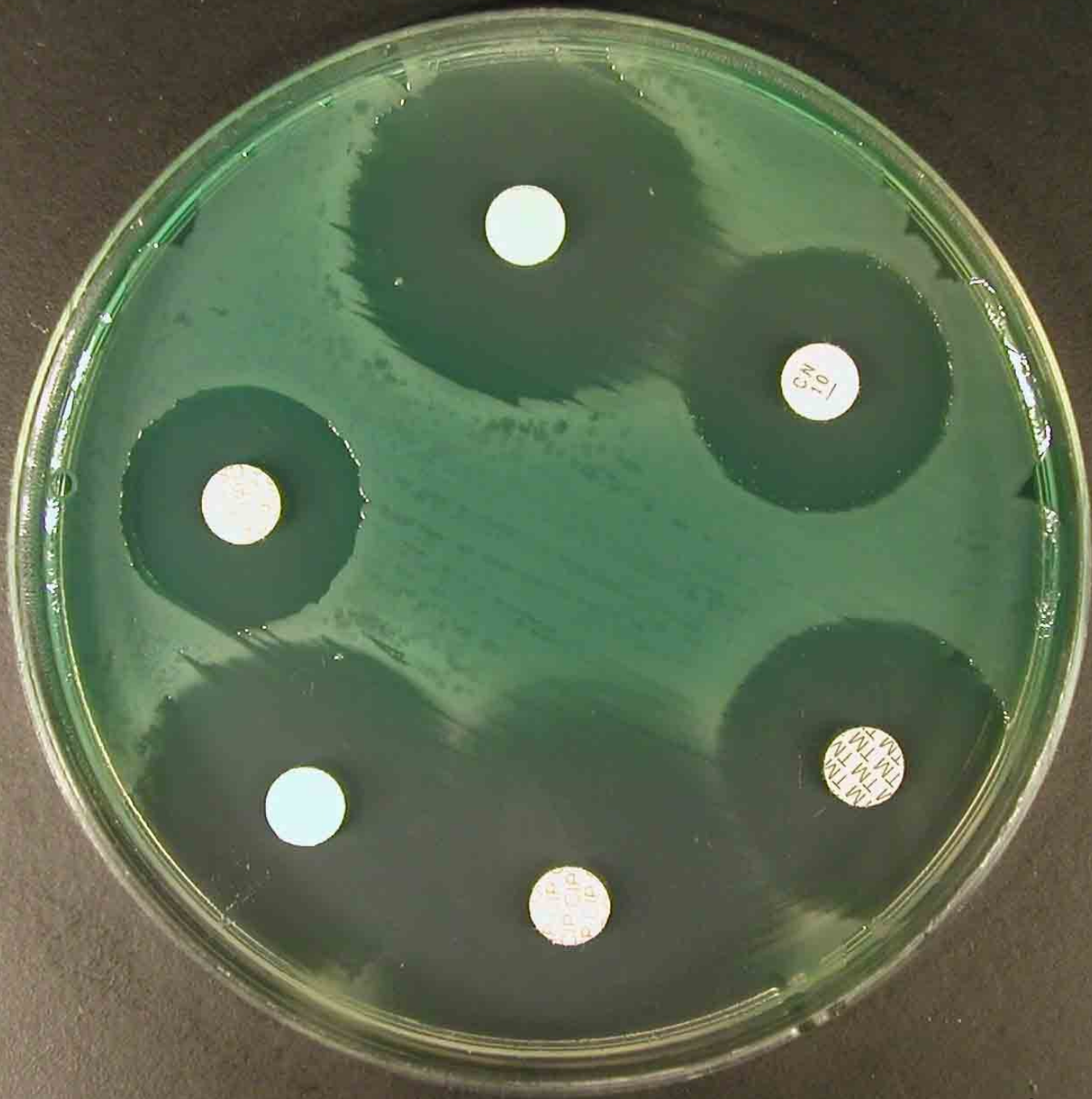


Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Ampicilin (aminopenicilin)	AMP	22 mm
Ko-amoxicilin (am.+inhib.)	AMC	18 mm
Cefuroxim (cefalosp. 2G)	CXM	20 mm
Tetracyklin (tetracyklin)	DO	29 mm
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	16 mm
Azithromycin (makrolid)	AZM	12 mm

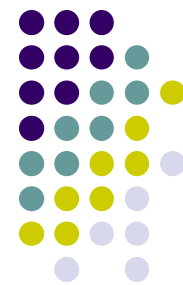
Tabulka zón citlivosti – neferm.



Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Piperacilin + tazobaktam	TZP	22 mm
Gentamicin (aminoglykos.)	CN	18 mm
Imipenem (karbapenem)	IPM	22 mm
Ciprofloxacin (chin 3 gen)	CIP	29 mm
Ceftazidim (CS 3 gen)	CAZ	16 mm
Colistin	CT	12 mm

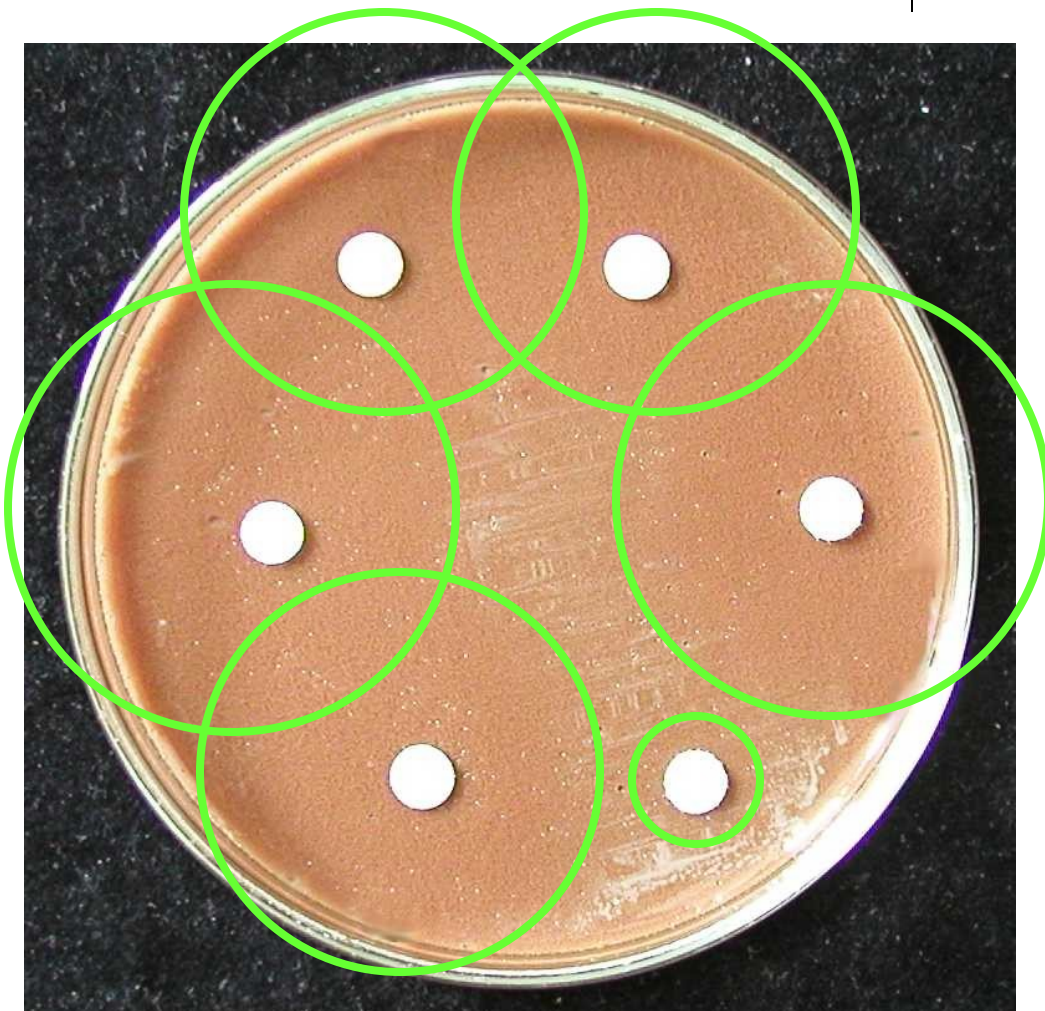


Zóny u hemofilů jsou často velké a splývající, což studenty mate!

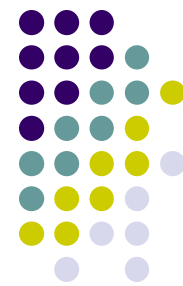


Jsou-li zóny tak velké, že se nedají změřit, tak je neměřte a prostě rovnou napište, že kmen je na dané antibiotikum citlivý.

Zeleně jsou vyznačeny hypotetické okraje zón – všimněte si, že z naprosté většiny buď splývají, nebo jsou mimo miskou



Úkol 7: *Pseudomonas* jako striktní aerob (na rozdíl od jiných)



- Pseudomonáda je striktně aerobní bakterie, nikoli fakultativně anaerobní jako například *Escherichia coli*, natož striktně anaerobní jako *Bacteroides fragilis* (bude probíráno v P 07).

Kmen	Bujón	VL-bujón	Výsledek
N	roste	neroste	Striktně aerobní bakterie
T	neroste	roste	Striktní anaerob
M	roste	roste	Fakultativní anaerob