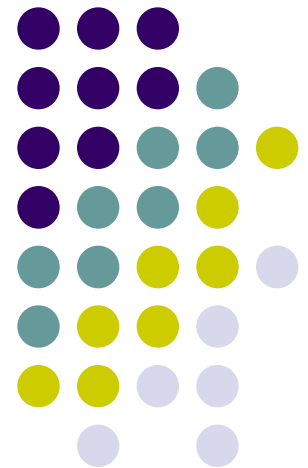
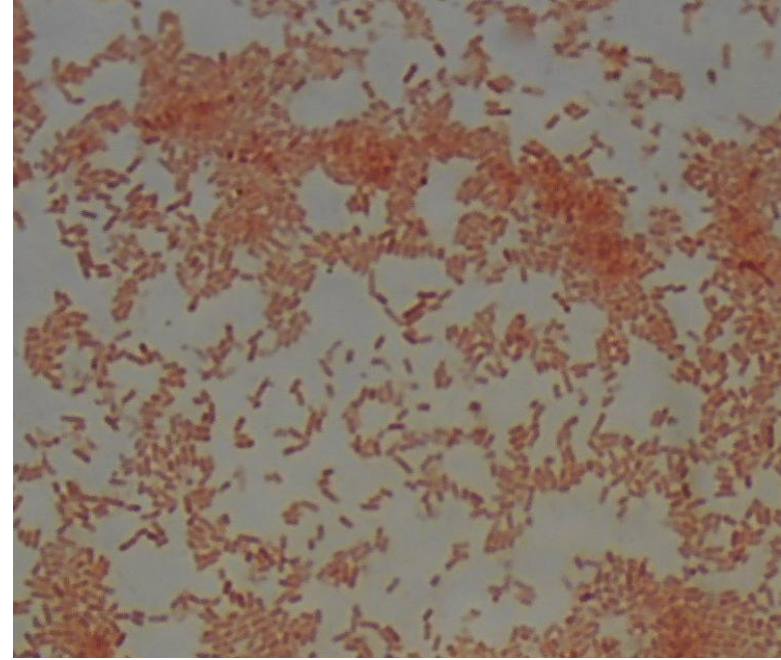

GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE II.



Rod *Haemophilus*

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



Klasifikace hemofilů



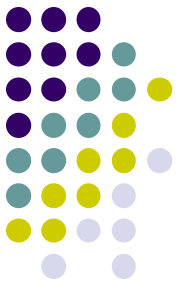
- ***Haemophilus influenzae***
 - pouzderný typ b (Hib)
 - pouzderné typy a, c, d, e, f
 - neopouzdržené kmeny
- ***Haemophilus parainfluenzae*** (mnohem běžnější a mnohem méně patogenní), ***Haemophilus aphrophilus*** a mnoho dalších druhů
- ***Haemophilus ducreyi***, původce pohlavně přenášené choroby **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 sinusitida.**
- Od r. 2001 očkování dětí

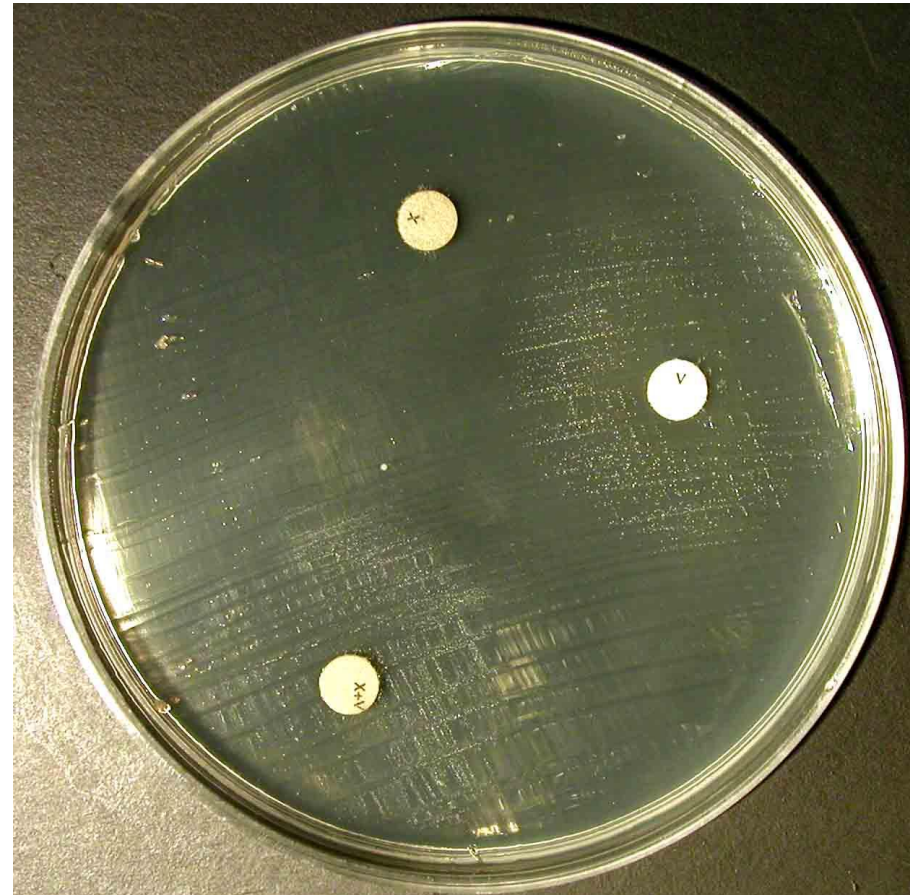
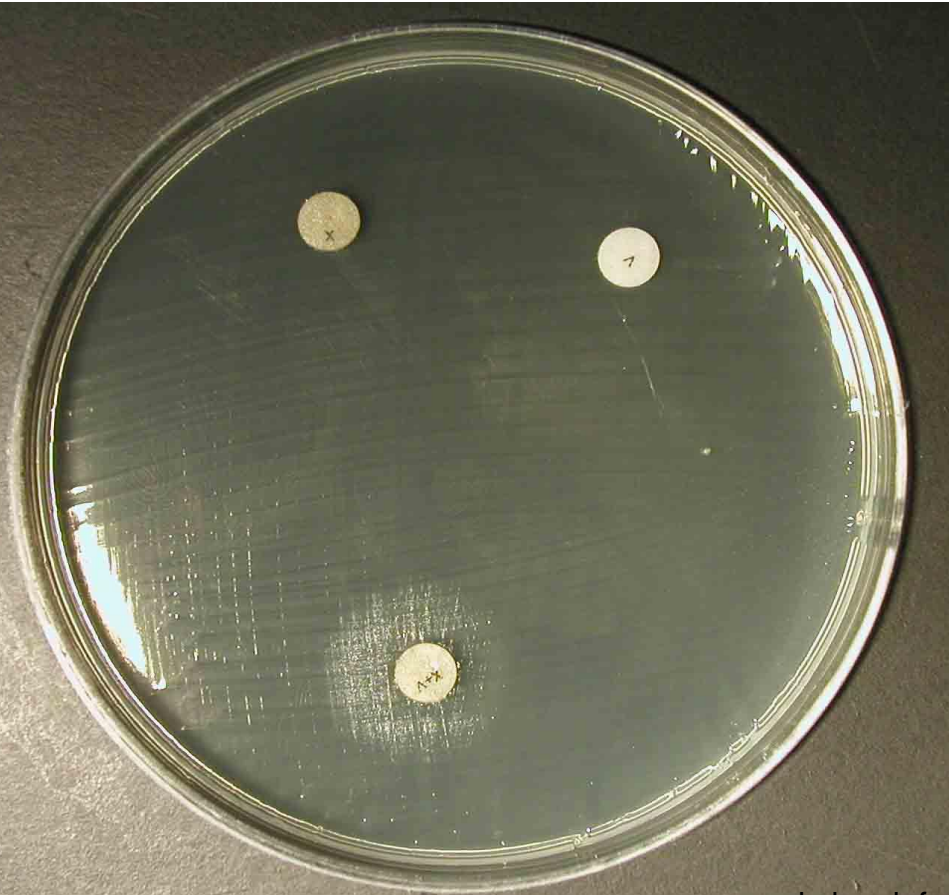
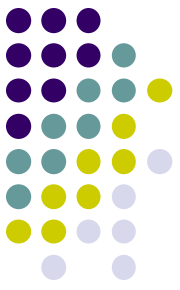




Růstové faktory hemofilů

- 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.

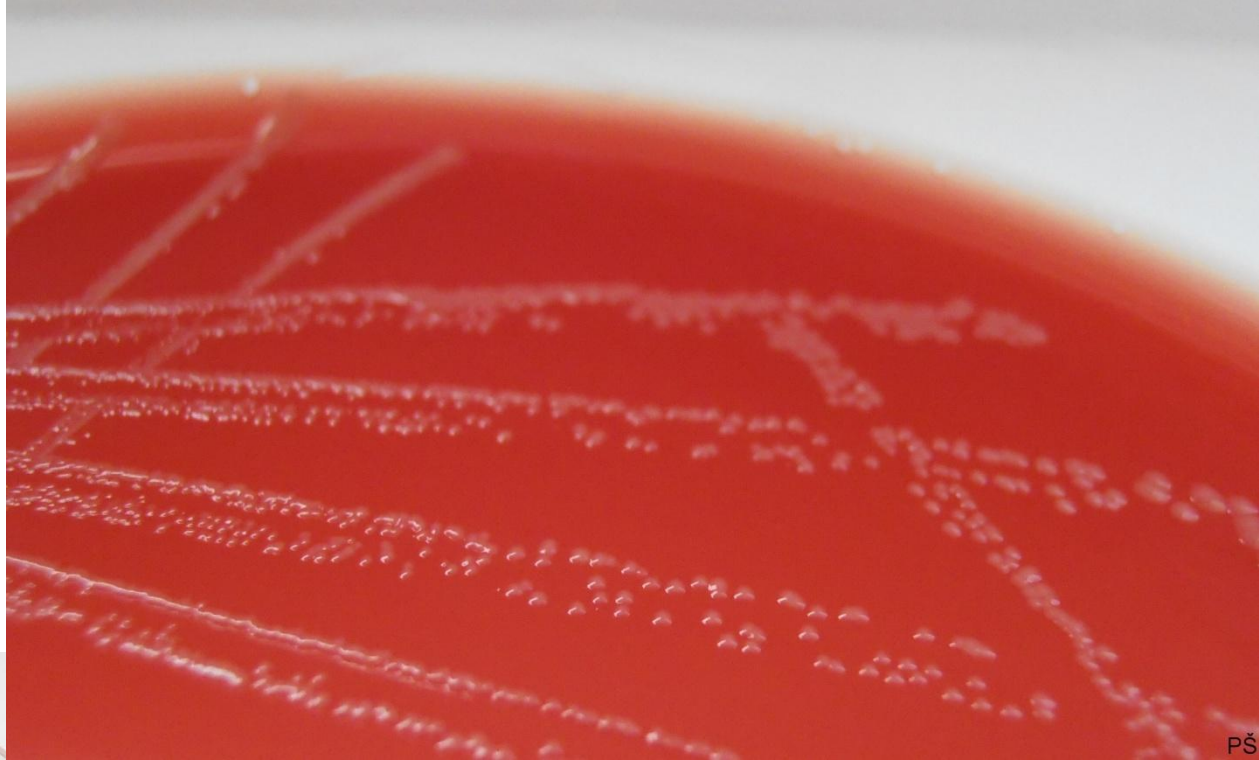
H. influenzae (vlevo),
H. parainfluenzae (vpravo)



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“.

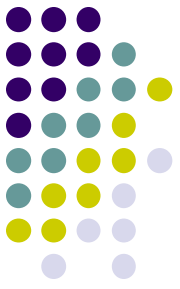


PŠ



PŠ

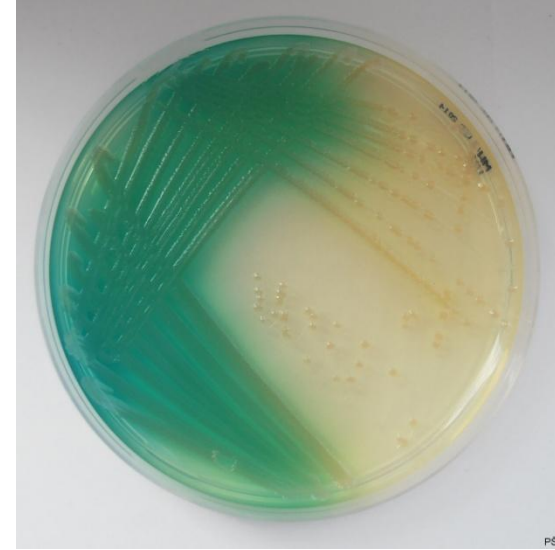
Gramnegativní nefermentující bakterie

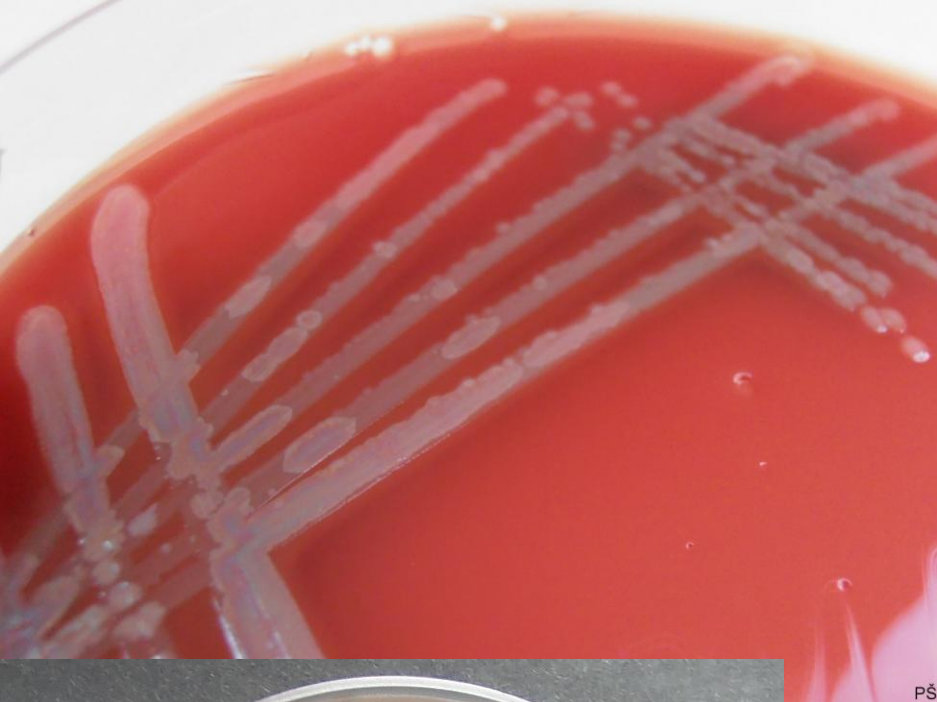


- Nejběžnější bakterie ze skupiny gramnegativních nefermentujících baktérií je ***Pseudomonas aeruginosa***
- Mezi další patří např. rody ***Acinetobacter***, ***Burkholderia*** nebo ***Stenotrophomonas***
- Striktně aerobní bakterie
- Obecně: Jsou to bakterie z vnějšího prostředí (saprofyté). Jejich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

Pseudomonas aeruginosa

- 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.





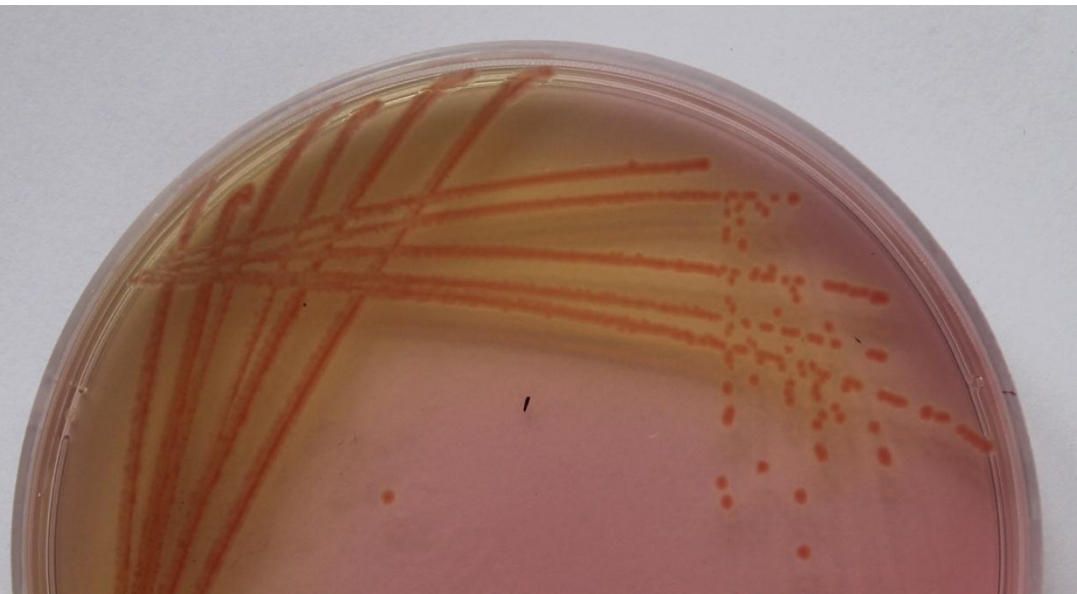
PŠ

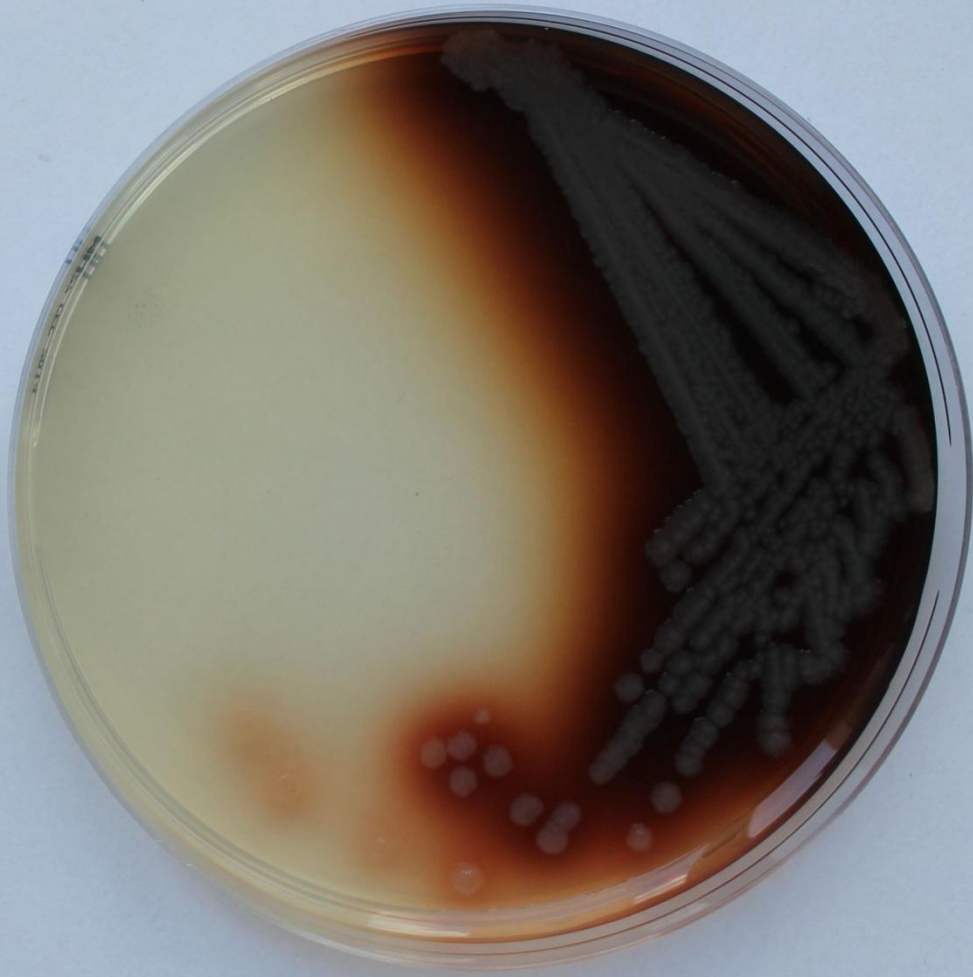


PŠ

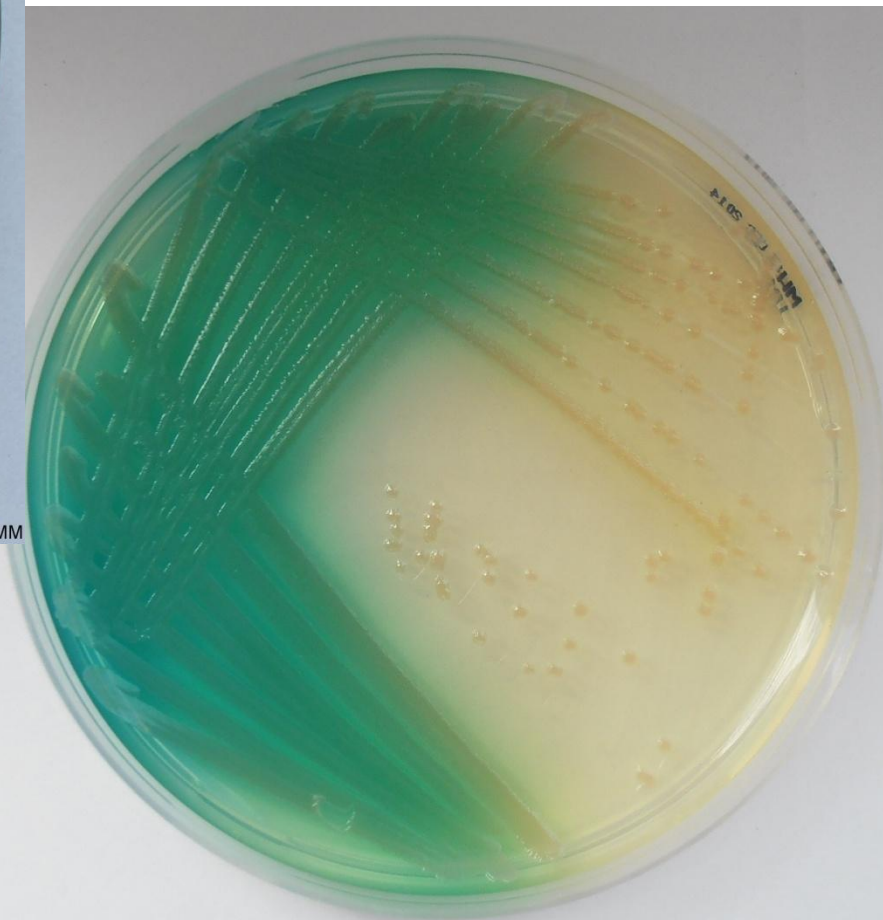


PŠ



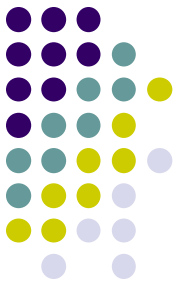


MM



PŠ

Nefermentující a cystická fibróza

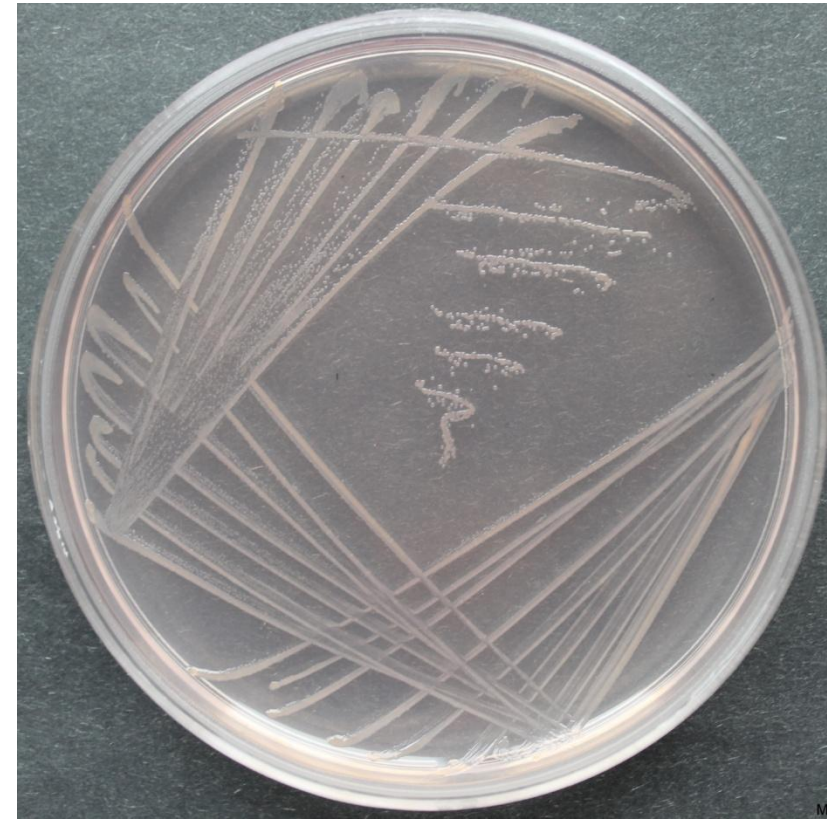
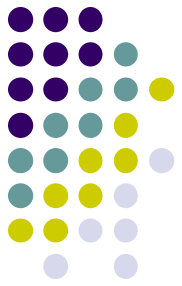


- Cystická fibróza je těžké, **vrozené onemocnění plic** s poruchou produkce normálního plicního surfaktantu. To vede ke změně charakteristikám plic, včetně mnohonásobně zvýšeného rizika infekce
- **Nejčastějšími původci** jsou:
Pseudomonas aeruginosa
Burkholderia cepacia
Staphylococcus aureus
Kmeny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

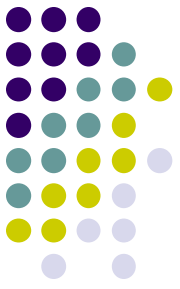
Burkholderia cepacia

Burkholderia cepacia

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



Burkholderia pseudomallei

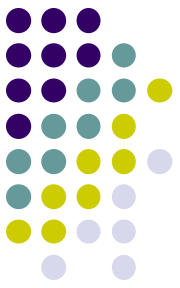


- *Burkholderia pseudomallei* je původcem těžkého onemocnění- **melioidózy**
- Příbuzná *B. mallei* způsobuje zoonózu zvanou malleus čili vozňřivka

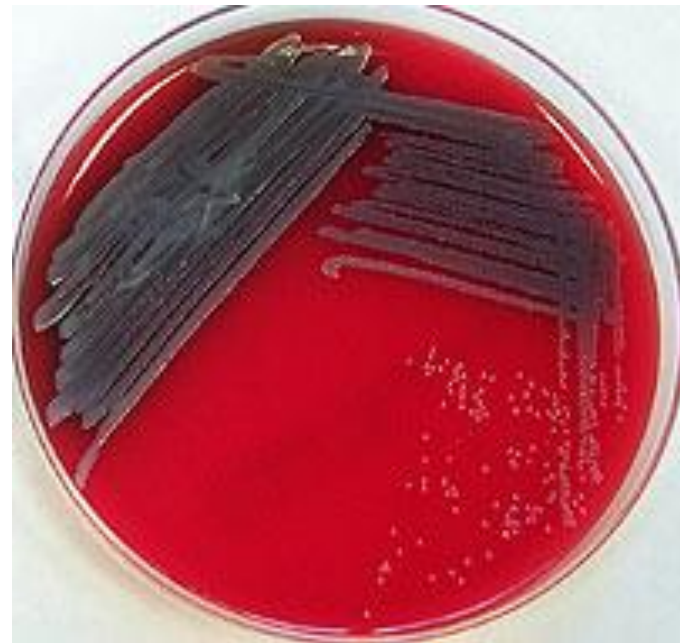
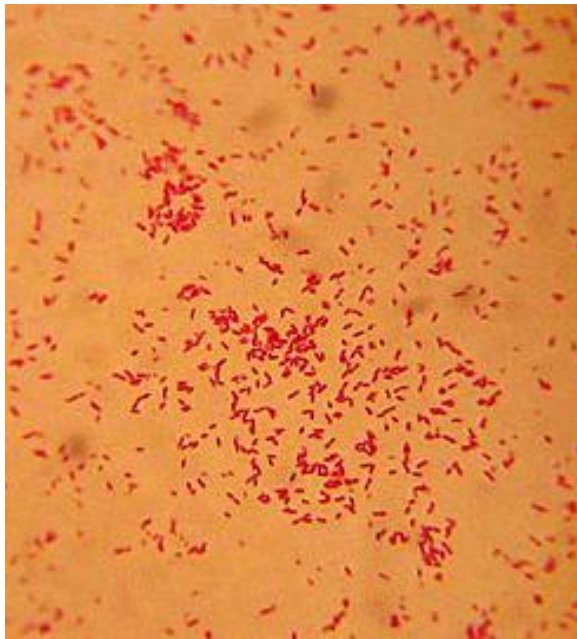
Nebezpečné i pro člověka



Stenotrophomonas maltophilia

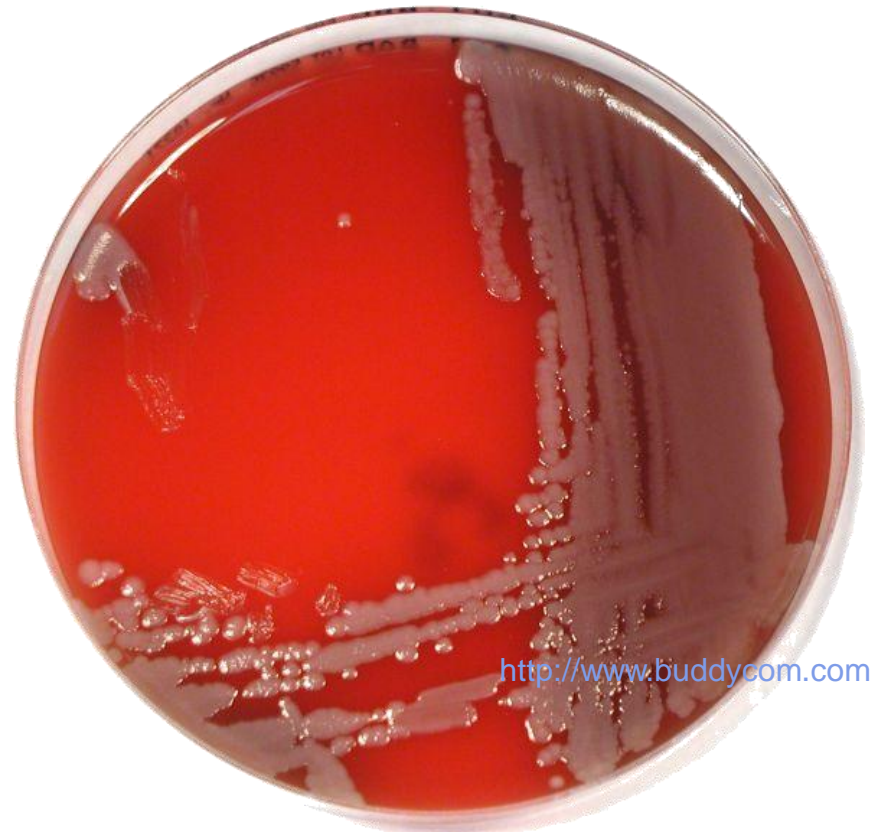
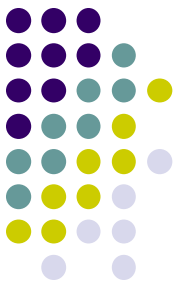


Původci respiračních infekcí, ranné infekce, infekce močových cest

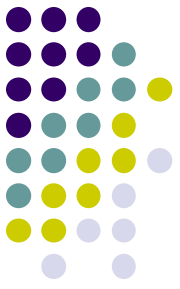


Acinetobacter sp.

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



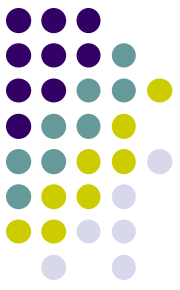
Diagnostika hemofilů a pasteurel



- 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 **droboučkové kolonie**, proto se používá disk k odclonění ostatních bakterií (**bacitracin**, ale ve vyšší koncentraci než v bacitracinovém testu)

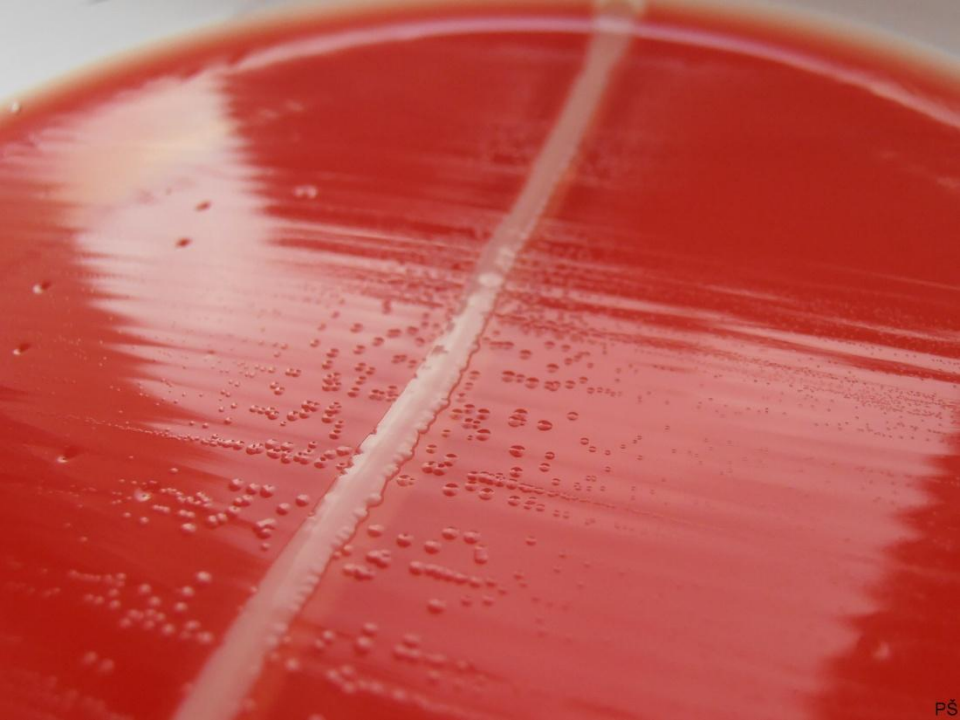
Hemofily na čokoládovém agaru



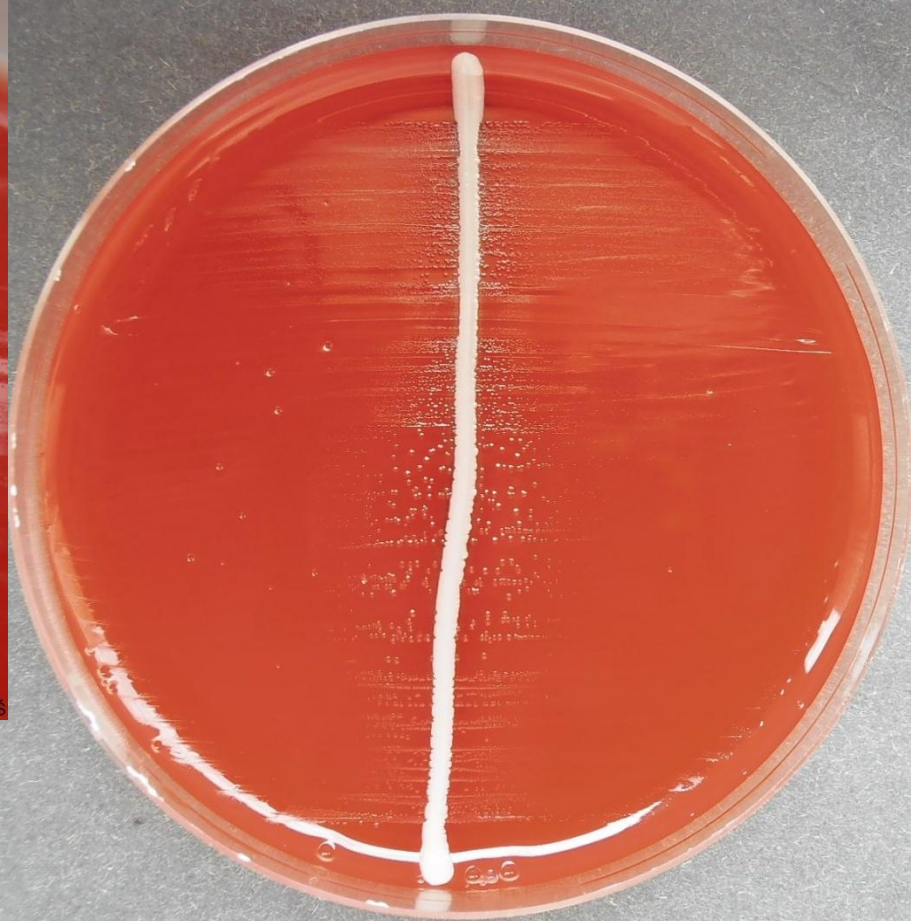


Satelitový fenomén

- 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.



PŠ

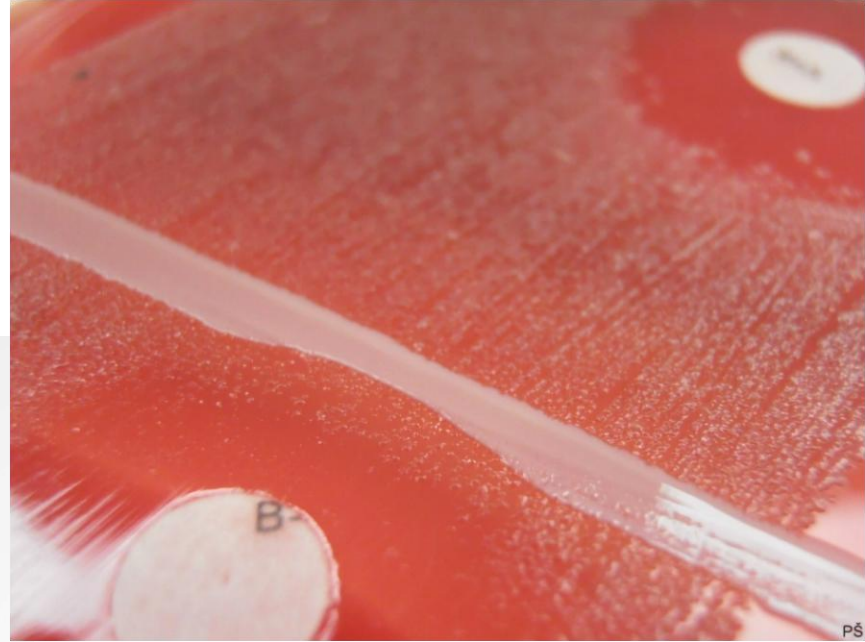
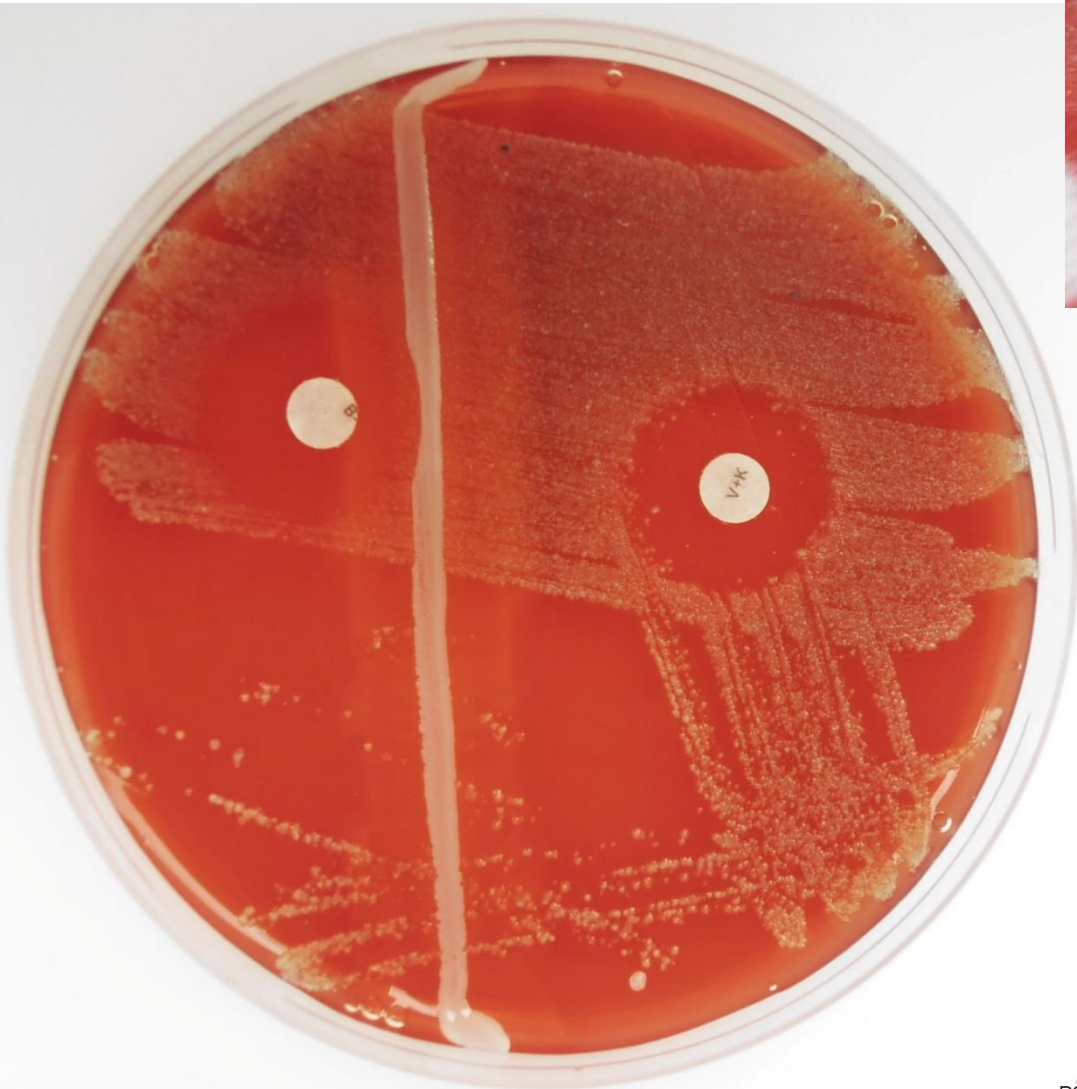


PŠ



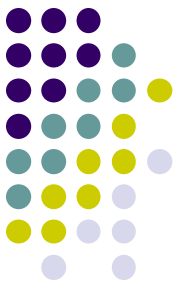
PŠ

Detekce hemofilů



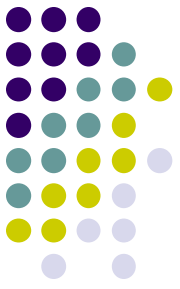
Hemofily jsou rezistentnější než bakterie běžné flóry, takže rostou uvnitř zóny, ovšem jen kolem stafylokokové čáry (satelitový fenomén!)

Diferenciální diagnostika G-nefermentujících



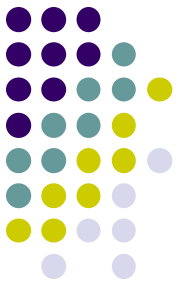
- Endova půda: jak již víme, rostou na ní z klinicky významných jen enterobakterie, příslušníci čeledi *Vibrionaceae* a gramnegativní nefermentující tyčinky
- Nefermentující odliší to, že nefermentují glukózu (např. Hajnova půda zůstává po kultivaci celá červená, nezmění vůbec barvu)

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 musíme rozlišit biochemicky, například NEFERMtestem 24

Úkol 1: Barvení kultur podle Grama



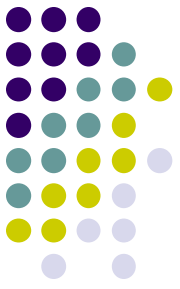
- Obarvěte podle Grama podezřelé kmeny (pro zopakování: natřít, nechat uschnout, fixovat plamenem, poté barvit: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní obj.)
- Rozlišíte bakterie podle tvaru a typu buněčné stěny. Pro vzájemné G- tyčinek musíte pokračovat dál.

Úkol 2: Kultivace bakterií



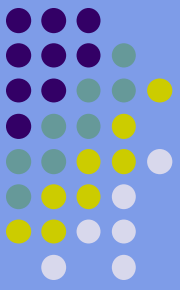
- Podívejte se na výsledky kultivace našich bakterií na čokoládovém agaru, krevním agaru, Endově a MH půdě. Popište morfologii kolonií na krevním agaru. U bakterií, které na krevním agaru nerostou, popište kolonie na čokoládovém agaru.
- **Hemofily** potřebují faktory z erytrocytů, ale nejsou samy schopny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

Úkol 3a: Satelitový fenomén

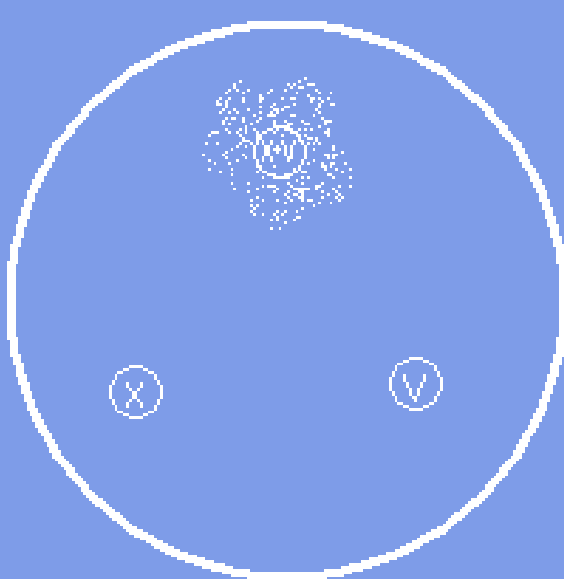


- Jak už víme, satelitový fenomén znamená růst hemofila pouze kolem stafylokokové čáry.
- Přítomnost satelitového fenoménu je důkazem, že jde opravdu o příslušníka rodu *Haemophilus*
- Kolonie jsou mrňavé, prohlížejte je důkladně!

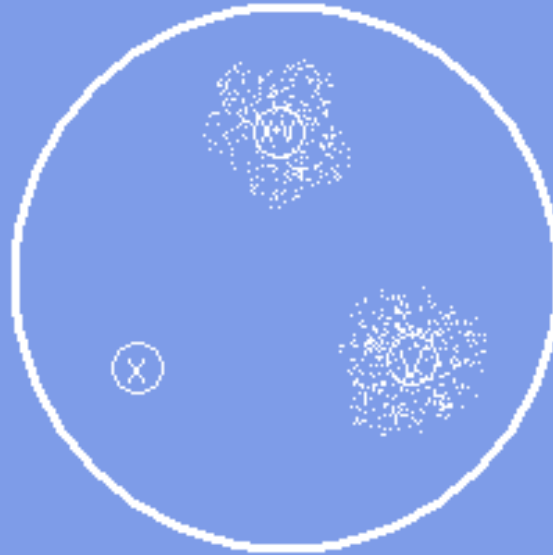
Úkol 3b: Test růstových faktorů hemofilů



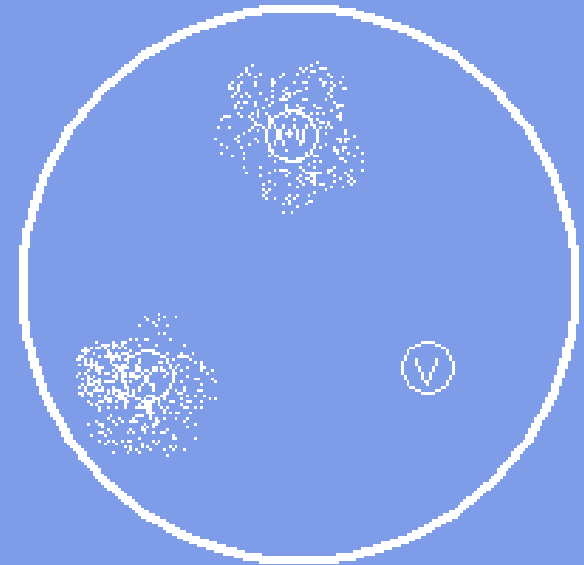
Jeden disk obsahuje faktor X, druhý faktor V, třetí směs obou



Haemophilus influenzae

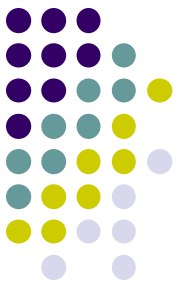


Haemophilus parainfluenzae

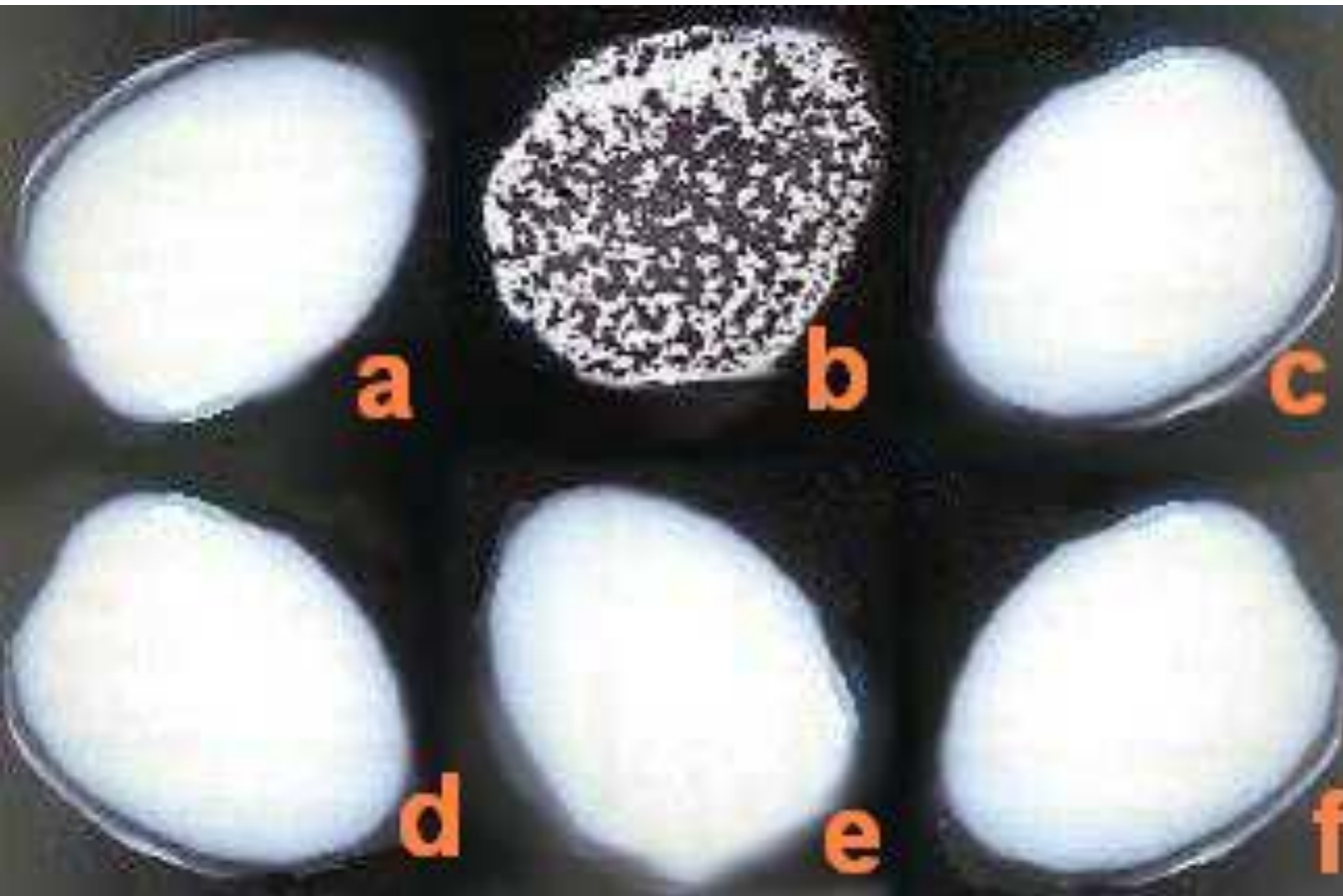


Haemophilus aphrophilus

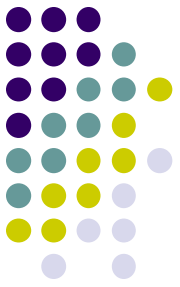
Úkol 3c – antigenní analýza – demonstrace výsledku



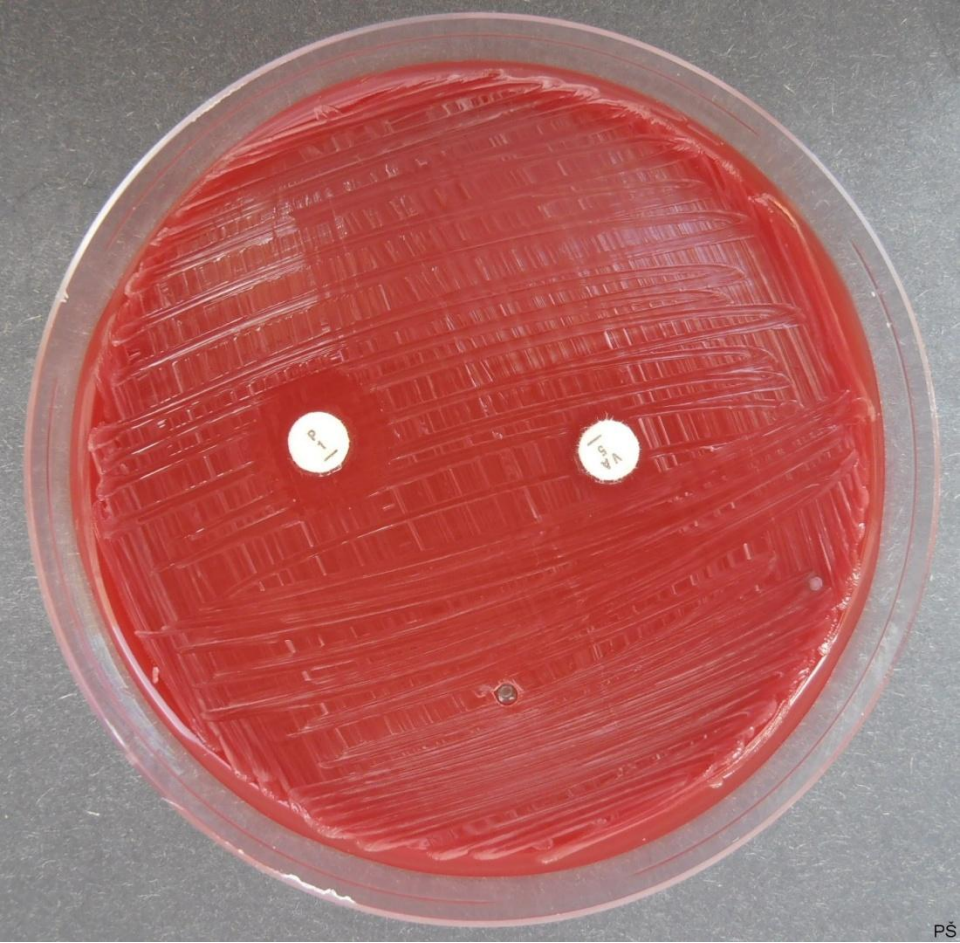
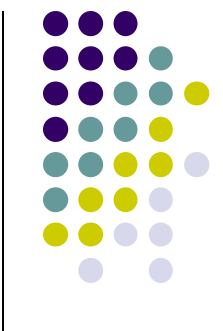
- Zapište výsledek aglutinace hemofilů dle obrázku (jde o kmen K):



Úkol 3d: detekce *Pasteurella* typickým vzorcem citlivosti



- Žádné gramnegativní bakterie nejsou citlivé na vankomycin. Vankomycin lze použít jen u grampozitivních,
- 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*.

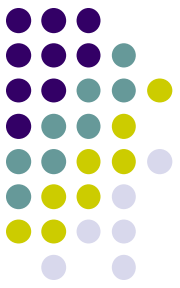


PŠ



PŠ

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

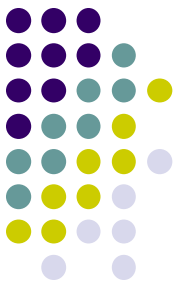


Úkoly 5a: Oxidázový test



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

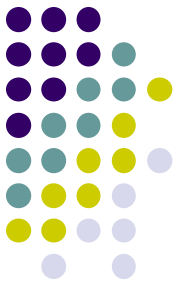




Úkol 5b: NefermTest 24

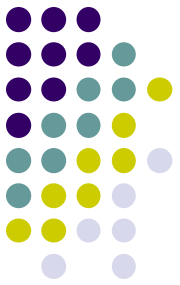
- Pro přesnou biochemickou identifikaci G–nefermentujících užíváme většinou Nefermtest 24 (nebo podobný jiných výrobců).
- Je to trojstrip (ne dvojstrip jako minulý týden)
- Kód se tu tvoří jiným způsobem:
 - první číslice je 0 (oxidáza –) nebo 1 (oxidáza +)
 - dalších 6 číslic pochází ze sloupců H až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

Úkol 6 – testy antibiotické citlivosti



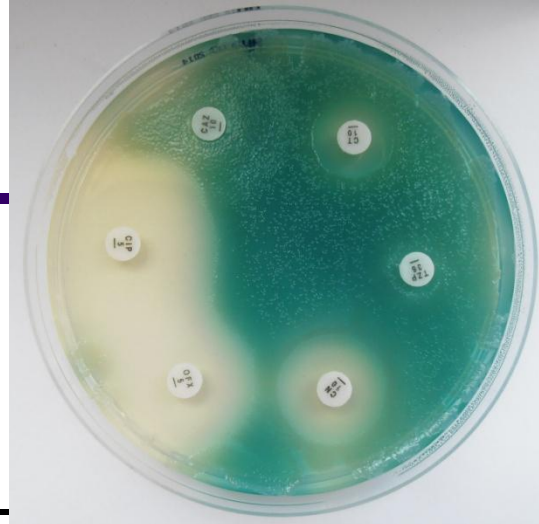
- Hemofily **nerostou** na MH agaru
- Zpravidla se používá **Levinthalův agar** (přefiltrovaný čokoládový agar), na kterém jsou zóny lépe viditelné než na klasickém čokoládovém agaru
- G– nefermentující naopak **rostou ochotně** na **nejrůznějších médiích**

6a Tabulka zón citlivosti – *Pasteurellaceae*



Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Ampicilin (aminopenicilin)	AMP	16 mm
Ko-amoxicilin (am.+inhib.)	AMC	16 mm
Cefuroxim (cefalosp. 2G)	CXM	25 mm
Tetracyklin (tetracyklin)	DO	25 mm
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	23 mm
Chloramfenikol	C	28 mm

6b Tabulka zón citlivosti – pseudomonáda



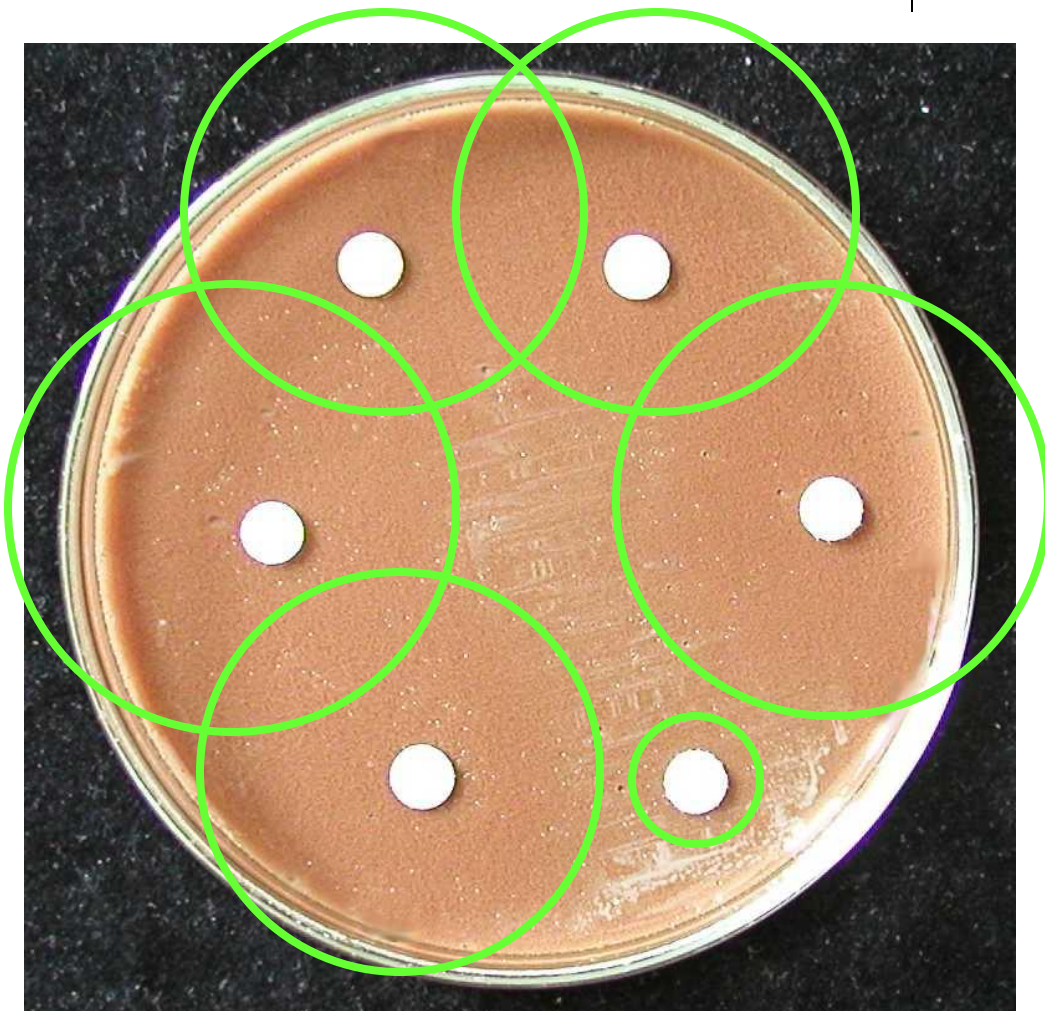
Antibiotikum	Zkratka	Referenč. zóna*
Piperacilin + tazobaktam	TZP	18 mm
Gentamicin (aminoglykos.)	CN	15 mm
Ofloxacin	OFL	13 mm
Ciprofloxacin (chin 3 gen)	CIP	25 mm
Ceftazidim (CS 3 gen)	CAZ	16 mm
Colistin	CT	11 mm

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

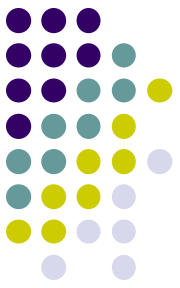


Jsou-li zóny tak velké, že se nedají změřit, tak je neměřte a prostě rovnou napište, že kmen je na dané antibiotikum citlivý.

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

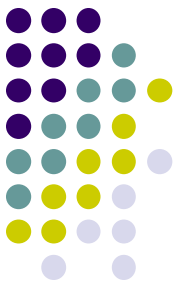


6c) Kontrola primárních rezistencí u kmenů burkholderie a stenotrofomonády



Kmen *S. maltophilia* by měl být primárně rezistentní na tato antibiotika....

Kmen *B. cepacia* by měl být primárně rezistentní na tato antibiotika....



Úkol 7: Vztahy bakterií ke kyslíku

- 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