

**Téma P06: Diagnostika gramnegativních bakterií jiných než těch z P04**

Ke studiu: *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, G– nefermentující tyčinky, *Neisseria*, *Moraxella*, *Legionella*, *Bordetella*, *Brucella*, *Francisella*; mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace

**Tabulka pro hlavní výsledky úkolů 1 až 5 (k postupnému vyplnění):**

Kmen		K	L	M	N	P	Q	R	S	T	U	V	W
Gramovo barvení – Úkol 1													
Kul- tiva- ce Úkol 2	Růst na KA (A/N/jen+#)												
	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 Pouzdrný typ: <i>Haemophilus</i>													
3d Test citlivosti	Penic.												
	Vanko.												
Fermentace gluk. Úkol 4 (Hajna)													
Oxidázový test Úkol 5a													
NEFERMtest 24, NEISSERIAtest a INAC (Úkoly 5b+c)													
<b>KONEČNÝ ZÁVĚR</b>													

\*Pro bakterie nerostoucí na krevním agaru (KA) použijte čokoládový agar (ČA)

#Napište „jen +“, pokud kmen roste pouze na obohaceném krevním agaru (označen jako KA+)

**Úkol 1: Mikroskopie suspektních kmenů**

Prohlédněte si preparáty a/nebo jejich obrázky v počítači. Zapište výsledky do tabulky.

**Úkol 2: Kultivace na agarových půdách**

Nejdříve napište, které bakterie rostou na krevním agaru a které ne. Pak, používající standardních procedur, popište kolonie všech kmenů na krevním agaru. Pouze ty, které na KA nerostou, popište na čokoládovém agaru nebo na „KA+“.

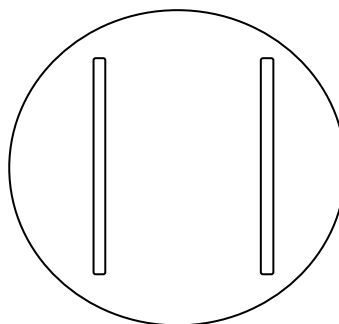
Poté popište růst na Endově půdě: „-“ pokud nerostou, „L-“ pokud rostou, ale nefermentují laktózu „L+“ pokud laktózu fermentují. Dejte pozor: některé kmeny mohou předstírat pozitivitu laktóзовého testu, ačkoli jsou laktóza negativní: produkují pigmenty, takže kolonie jsou tmavé, avšak okolí je tmavé. V případě pochyb porovnejte s 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: proveďte 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.

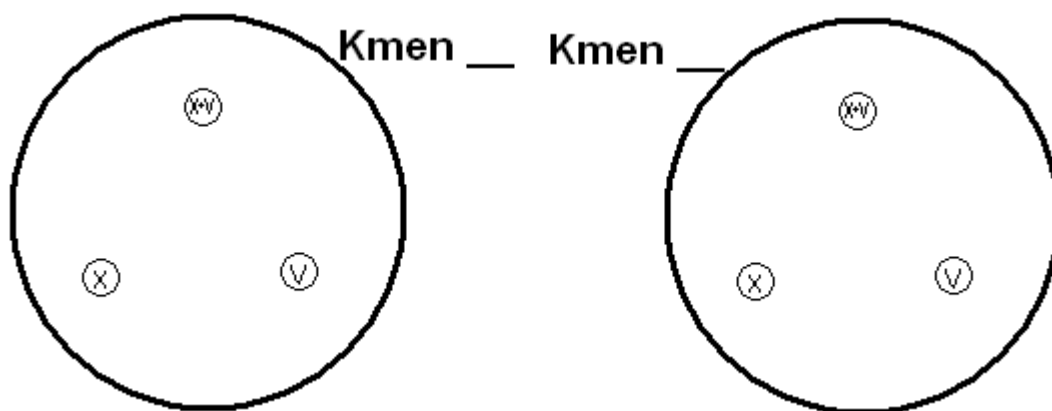


*Staphylococcus aureus*

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.

#### 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

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 G– koků

#### a) Oxidázový test

Demonstrace oxidázového testu u tří G– nefermentujících bakterií a u G– koků. Zapište výsledky do tabulky.

**Nefermentující tyčinky:** *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.

**G– koky:** Neisserie i moraxely jsou oxidáza pozitivní, i když u moraxel může být reakce opožděná.

#### b) Podrobné biochemické testování

Vyhodnoťte předložené výsledky NEFERMtestu 24, který byl připraven DVA dny předem (rozdíl oproti jiným biochemickým testům) 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											

U kmenů určených jako G– koky odečtete biochemický mikrotest (NEISSERIAtest fy Lachema) naočkovaný předchozí den. Na rozdíl od předchozího má jen jeden řádek. První jamka obsahuje negativní kontrolu, takže vlastní test začíná až od DRUHÉ jamky! Zakápnutí Lugolovým roztokem již bylo provedeno, nemusíte je provádět sami. Povšimněte si nízké biochemické aktivity některých neisserií. Porovnejte výsledek s růstovými vlastnostmi (kmen určený jako gonokok by měl růst pouze na čokoládovém agaru, meningokok pouze na čokoládovém a bohatém krevním agaru).

Kmen:	H	G	F	E	D	C	B	A		Kód:	Identifikace:
	NEC										
	×	1	2	4	1	2	4	1			
	×										
Kmen:	H	G	F	E	D	C	B	A		Kód:	Identifikace:
	NEC										
	×	1	2	4	1	2	4	1			
	×										
Kmen:	H	G	F	E	D	C	B	A		Kód:	Identifikace:
	NEC										
	×	1	2	4	1	2	4	1			
	×										
Kmen:	H	G	F	E	D	C	B	A		Kód:	Identifikace:
	NEC										
	×	1	2	4	1	2	4	1			
	×										

### Úkol 6: Testy citlivosti patogenů na antibiotika

Z časových důvodů odečtete citlivost jen u pseudomonády, i když by se normálně provádělo testování i u členů čeledi *Pasteurellaceae* a u patogenních G– koků.

#### 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 (CN) 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>					

