

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.

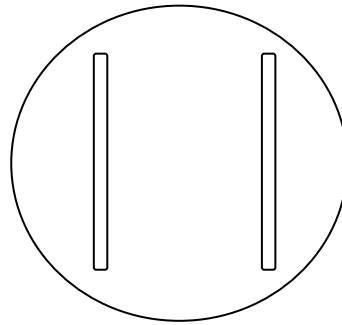
Poté popíšete růst na Endově půdě: „-“ pokud nerostou, „L-“ pokud rostou, ale nefermentují laktózu „L+“ pokud laktózu fermentují. Dejte pozor: některé kmeny mohou předstírat pozitivitu laktózoového testu, ačkoli jsou laktóza negativní: produkují pigmenty, takže kolonie jsou tmavé, avšak okolí je světlé.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

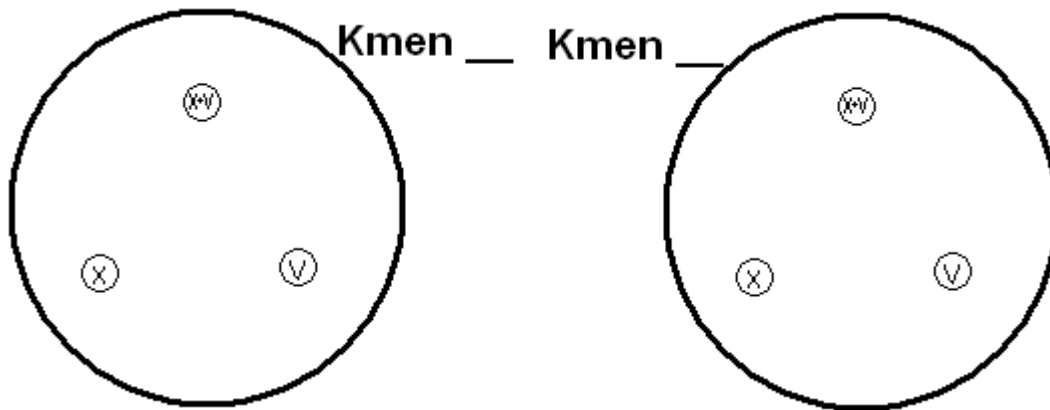


Staphylococcus aureus

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 silnějším (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 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		
Tetracyklin (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			ciprofloxacín (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		

Poznámka: Tazobaktam působí jako inhibitor betalaktamázy, zároveň ale má i svoji vlastní antimikrobiální účinnost.

6d) Kontrola primárních rezistencí u kmenů burkholderie a stenotrofomonády

TABLE 2. Intrinsic resistance in non-fermentative Gram-negative bacteria; non-fermentative Gram-negative bacteria are also intrinsically resistant to benzylpenicillin, cefoxitin, cefamandole, cefuroxime, glycopeptides, fusidic acid, macrolides, lincosamides, streptogramins, rifampicin, daptomycin, and linezolid

Rule no.	Organisms	Ampicillin	Ampicillin-sulbactam	Ticarcillin	Ticarcillin-clavulanic acid	Piperacillin	Piperacillin-tazobactam	Cefazolin	Cefotaxime	Ceftazidime	Ceftazidime	Ertapenem	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacin	Chloramphenicol	Aminoglycosides	Trimethoprim	Trimethoprim-sulphamethoxazole	Fosfomycin	Tetracycline/tigecycline	Polymyxin B/colistin
2.1	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	R ^a	R ^a	-	-	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	R	-	R	-	-
2.2	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	R	-	-	-	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.3	<i>Burkholderia cepacia</i> complex ^b	R	R	R	R	-	-	R	R	R	-	R	-	-	R	-	R ^c	-	-	-	-	-
2.4	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	R	-	R	R	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	R	R	R	R	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	-	-	-	-	R	R	R	-	R	-	-	-	-	Note ^d	-	-	-	-	-
2.7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	R	-	R	R	R	R	R	-	R	-	-	-	-	R ^e	R ^e	R ^e	R	-	-

R, resistant.
^a*Acinetobacter baumannii* may appear to be susceptible to ampicillin-sulbactam, owing to the activity of sulbactam against this species.
^b*Burkholderia cepacia* complex includes different species. Some strains may appear to be susceptible to some β-lactams in vitro, but they are clinically resistant and are shown as R in the table.
^c*Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia* are intrinsically resistant to all aminoglycosides. Intrinsic resistance is attributed to poor permeability and putative efflux. In addition, most *Stenotrophomonas maltophilia* isolates produce the AAC(6)-Ic enzyme.
^d*Pseudomonas aeruginosa* is intrinsically resistant to kanamycin and neomycin, owing to low-level APH(3)-IIb activity.
^e*Pseudomonas aeruginosa* is typically resistant to trimethoprim and moderately susceptible to sulfonamides. Although it may appear to be susceptible in vitro to trimethoprim-sulphamethoxazole, it should be considered to be resistant.
^f*Stenotrophomonas maltophilia* may show low ceftazidime MIC values but should be considered to be resistant.
^g*Stenotrophomonas maltophilia* is typically susceptible to trimethoprim-sulphamethoxazole but resistant to trimethoprim alone.

©2011 The Authors
 Clinical Microbiology and Infection ©2011 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 19, 141-160

Ve výše uvedené tabulce přirozených rezistencí, vydané organizací EUCAST#, vidíte přirozené rezistence u nejběžnějších gramnegativních nefermentujících bakterií. Na bočním stole vidíte testy citlivosti u burkholderie a stenotrofomonády. Není třeba měřit zóny, jsou již změřeny.

EUCAST = The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Na včúku Petriho misky můžete najít:

1. sloupec: přirozené rezistence daného kmene (opsané z tabulky EUCAST nahoře): „R“ = kmen je přirozeně rezistentní, „-“ = kmen není přirozeně rezistentní. **Jsou zde zapsány pouze přirozené rezistence na antibiotika z naší sestavy (PS1).** *Poznámka: Tabulka nahoře neobsahuje ofloxacin (OFX), ale kmény primárně rezistentní k ciprofloxacínu můžeme považovat za rezistentní i k ofloxacinu. Tabulka také jmenovitě neobsahuje gentamicin (CN), ale výsledek může být odvozen od „Aminoglykosidů“.*

2. sloupec: výsledky měření zón a jejich porovnání s referenční zónou: S = citlivý (susceptible), R = rezistentní
 Zapište na následující stranu, jaké jsou podle EUCAST přirozené rezistence *B. cepacia* a *S. maltophilia* (opište z prvního sloupce).

Poté zkontrolujte, zda jsou všechny přirozené rezistence vyjádřeny podle následující tabulky:

Přirozená rezistence (R)?	Změřeno jako	Závěr
-	citlivé (S)	výsledek je v souladu, kmen lze dát do výsledku jako „citlivý“
R	rezistentní (R)	výsledek je v souladu, kmen musí figurovat ve výsledku jako „rezistentní“
-	rezistentní (R)	výsledek je v souladu, kmen musí figurovat ve výsledku jako „rezistentní“ (jde o sekundární rezistenci)
R	citlivé (S)	výsledek není v souladu, kmen je třeba dát do výsledku jako „rezistentní“, můžeme hovořit o „falešné citlivosti“

Nakonec ještě zapište, zda je kmen citlivý na některá antibiotika (zapište kmen jako citlivý jen na ta antibiotika, u kterých může tento výsledek být uveden ve výsledku, tj. nikoli u těch, které byly změřeny jako citlivé, ale je nutno je kvůli přirozené rezistenci považovat za rezistentní).

Zapište:

Kmen ____ (*S. maltophilia*) je podle EUCAST primárně rezistentní na tato antibiotika: _____
 _____.

Citlivost zjištěná difusním diskovým testem s tímto
 souhlasí (= není tu žádná „falešná citlivost“)
 nesouhlasí v případě tohoto antibiotika či těchto antibiotik: _____

Kmen je citlivý na antibiotika: _____

Kmen ____ (*B. cepacia*) je podle EUCAST primárně rezistentní na tato antibiotika: _____
 _____.

Citlivost zjištěná difusním diskovým testem s tímto
 souhlasí (= není tu žádná „falešná citlivost“)
 nesouhlasí v případě tohoto antibiotika či těchto antibiotik: _____

Kmen je citlivý na antibiotika: _____

Poznámka: Pokud je však diskrepancí více, je zpravidla vhodné ověřit citlivost kvantitativními testy, případně zkontrolovat, zda bylo správně provedeno rodové a druhové určení kmene.

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			