

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 Pouzderňý 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)													
KONEČNÝ ZÁVĚR													

*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+“.

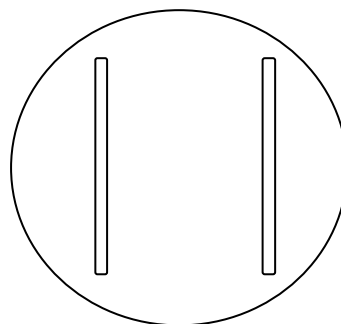
Poté popište růst na Endově půdě: „-“ pokud nerostou, „L-“ pokud rostou, ale nefermentují laktózu „L+“ pokud laktózu fermentují. Dejte pozor: některé kmeny mohou předstírat pozitivitu laktóзовého testu, ačkoli jsou laktóza negativní: produkují pigmenty, takže kolonie jsou tmavé, avšak okolí je tmavé.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

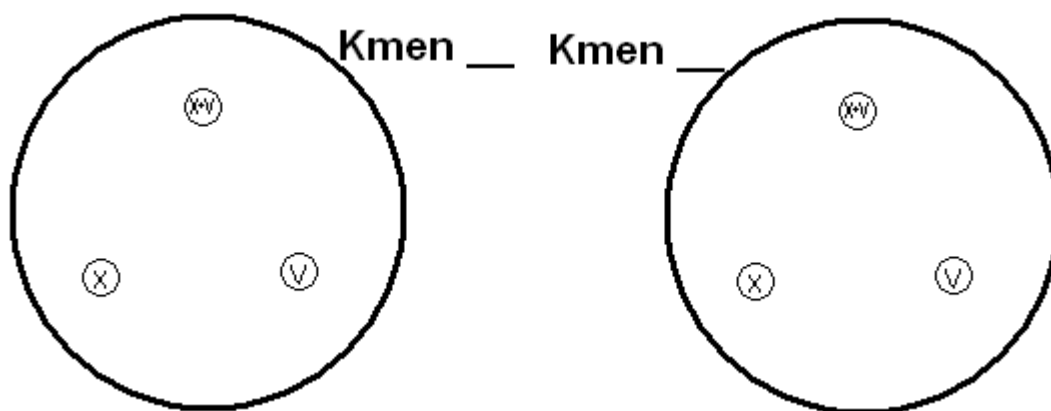


Staphylococcus aureus

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.

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>					

Úkol 7: Přímý průkaz antigenů původců meningitid v mozkomíšním moku (demonstrace diagnostické soupravy a videoklip)

Meningokoková meningitida je závažná choroba. Nelze zde čekat na kultivaci, je nutno využít rychlých diagnostických metod. Vedle mikroskopie se zde využívá především latexové aglutinace.

a) Demonstrace soupravy k latexové aglutinaci

Prohlédněte si soupravu a zapište názvy mikrobů, které mohou být touto metodou diagnostikovány.

b) Videoklip

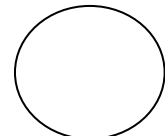
Prohlédněte si videoklip. V této ukázce se jako patogen projevil _____

Úkol 8: Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisela)

a) Diagnostika bordetel

Diagnostika pertuse je v současnosti založena na serologii (aglutinace a ELISA), která vždy vyžaduje dva vzorky séra. Jinou diagnostickou metodou je PCR. Nicméně důležitou a klasickou metodou stále zůstává kultivace.

Existuje speciální médium pro druh *Bordetella pertussis* a speciální způsob očkování na tuto půdu. Na rozdíl od mnoha jiných bakterií je *Bordetella* rezistentní k penicilinu. Proto začínáme kápnutím kapky penicilinového roztoku doprostřed misky s agarem. Výtěr je smíchán s kapkou a očkován ve směru spirály. Poté jsou očkovány radiální paprsky kličkou. Napište název půdy a zakreslete postup očkování podle obrázku.



Název půdy: _____

b) Demonstrace kultivační půdy na legionely

Prohlédněte si kultivační půdu na legionely. Zapište o ní několik údajů.

Zkratka	Co znamenají jednotlivá písmena ve zkratce	Barva půdy

c) Průkaz protilátek proti tularémii

V praktiku P02 a P05 jste viděli aglutinaci použitou k antigenní analýze. Aglutinace se ale dá použít také k průkazu protilátek. Výsledek ale vypadá jinak. Sérum se řadí geometrickou řadou s koeficientem 2.

Na bočním stole je vlhká komůrka s výsledky nepřímého průkazu francisel aglutinací. Jamky s pozitivní reakcí vykazují příslušnost aglutinátu (větší terčík nepravidelného tvaru), důlky s negativní reakcí ukazují sedimentaci bakterií (menší, výrazně bílé kulaté kolečko). První důlek je „technický“, dále za čarou následují titry 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 atd. Pokuste se o závěrečnou interpretaci, víte-li, že jakýkoli titer se považuje za „suspektní“, samozřejmě jen pokud nejde o pozitivní kontrolu. Doplňte do následující tabulky:

		Interpretace: Jakýkoli titer se považuje za suspektní, při rozhodování o léčbě je nutno vzít v úvahu klinický stav pacienta.
		Interpretace:
K+		TITR = 1: _____
1		TITR = 1: _____
2		TITR = 1: _____
3		TITR = 1: _____

d) Diagnostika protilátek proti brucelóze

Diagnostika brucelózy (Bangova choroba – způsobena *B. abortus*) byla provedena nepřímým průkazem – metodou ELISA ve třídách IgG i IgM. Absorbance byla změřena spektrofotometrem a výsledky byly expertním systémem přímo vyhodnoceny jako „pozitivní“, „hraniční“ či „negativní“. Výsledky najdete na stole. Pokuste se o závěrečnou interpretaci, pokud víte, že třída IgM svědčí pro aktivní infekci, samotný nálezn IgG pro dříve prodělanou. Více se o serologických reakcích a jejich interpretaci dozvíte ve zvláštním praktickém cvičení.

Pacient	Výsledek IgM	Výsledek IgG	Konečný závěr
Alice			
Bob			
Claudia			
David			

Poznámka: Brucelóza je vzácnou nemocí, přečtěte řada laboratorní včetně té naší diagnostiku neprovádí. Z tohoto důvodu pracovní listy použité pro tento úkol nejsou skutečné, ale jsou to upravené pracovní listy z jiné serologické reakce. Nicméně skutečné pracovní listy pro diagnostiku brucel by vypadaly stejně či velmi podobně.