HEMOFILY, NEISSERIE

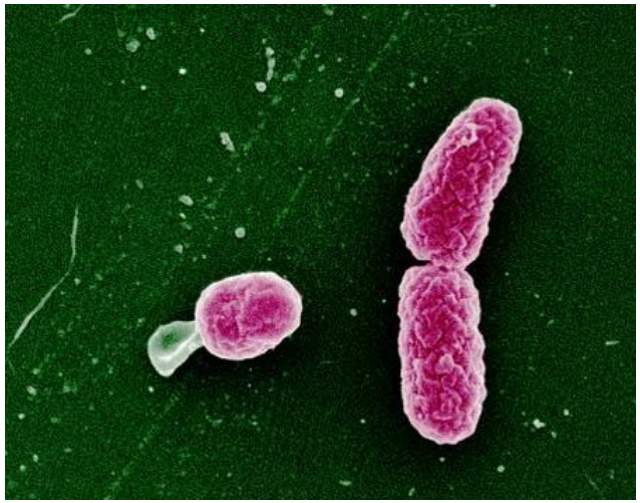
MYKOBAKTERIE, KORYNEBAKTERIE

PRAKTICKÁ ČÁST

1. IDENTIFIKACE HEMOFILŮ

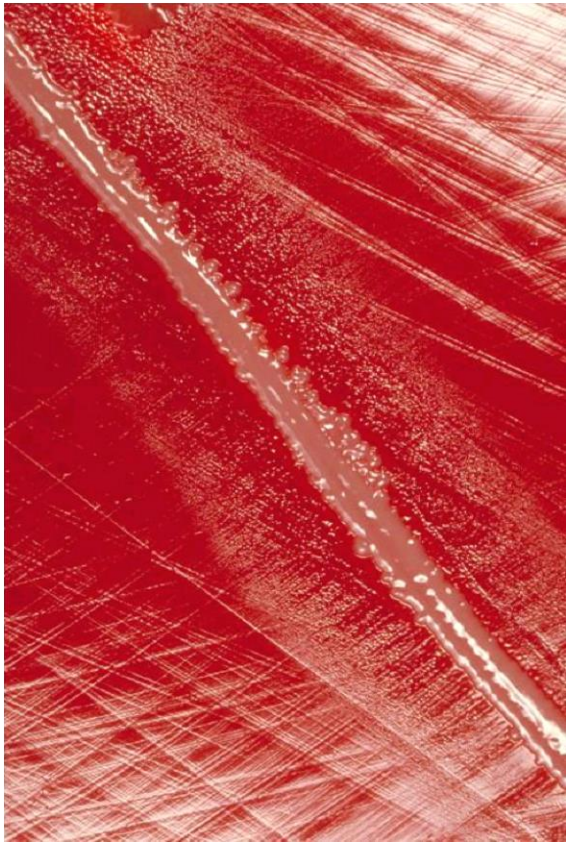
Mikroskopie hemofilů

- Gram negativní (červené) tyčinky



Kultivace hemofilů

- rostou na čokoládovém agaru, který dodává potřebné růstové faktory X (hemin) a V (nikotinamid-adenin-dinukleotid, NAD)
- na krevním agaru rostou pouze v přítomnosti kmene *Staphylococcus aureus* – **SATELITISMUS** (uvolnění faktoru X a produkce faktoru V)



Satelitismus

Pomůcky: kmeny *Haemophilus influenzae, Haemophilus parainfluenzae*, *Staphylococcus aureus*, kultivační půdy, kličky

Postup: na krevní agar naočkujeme masivně kličkou oba kmeny, každý na svou polovinu. Poté středem kultivace naočkujeme čarou kmen *Staphylococcus aureus*. Kultivujeme při 37°C, 24 hod., 5-10% CO_2.

Hodnocení: hemofily vyrůstají v drobných koloniích podél stafylokokové čáry.

Identifikace pomocí růstových faktorů

- **Princip:** Konkrétní druh hemofila vyrůstá na živném agaru pouze v okolí disku obsahující potřebný růstový faktor

  - ***H. influenzae* – faktor X a V**
  - ***H. parainfluenzae* – faktor V**

Identifikace pomocí růstových faktorů

- **Pomůcky:**

  kmeny *Haemophilus influenzae, Haemophilus parainfluenzae*, disky s faktory X, V a X+V, kultivační půdy, kličky, jehly, fixy, dezinfekce

- **Postup:**

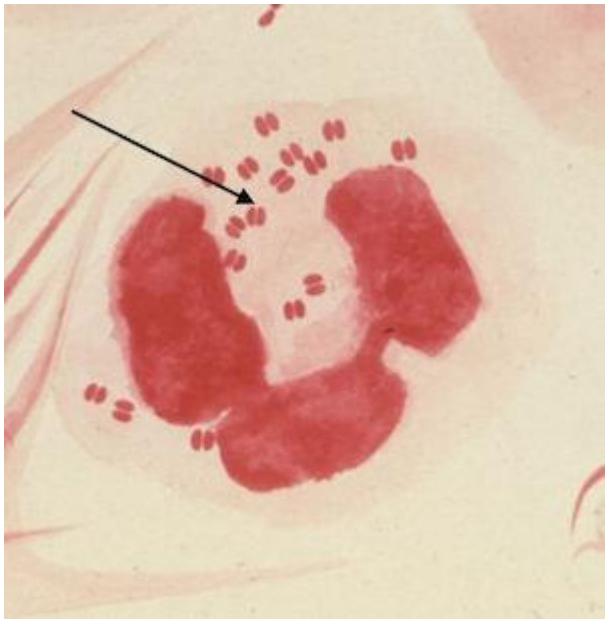
  na Müeller-Hintonův agar naočkujeme masivně kličkou oba kmeny, každý na svou polovinu. Poté položíme na každý naočkovaný kmen disky s růstovými faktory X, V a X+V. Kultivujeme při 37°C, 24 hod., 5-10% CO_2

PRAKTICKÁ ČÁST

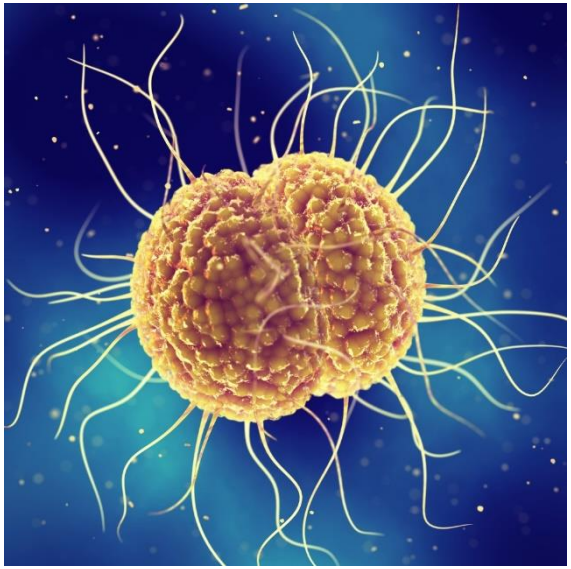
2. IDENTIFIKACE NEISSERIÍ

Mikroskopie neisserií
Neisseria gonorrhoeae

- Gram negativní (červené) diplokoky

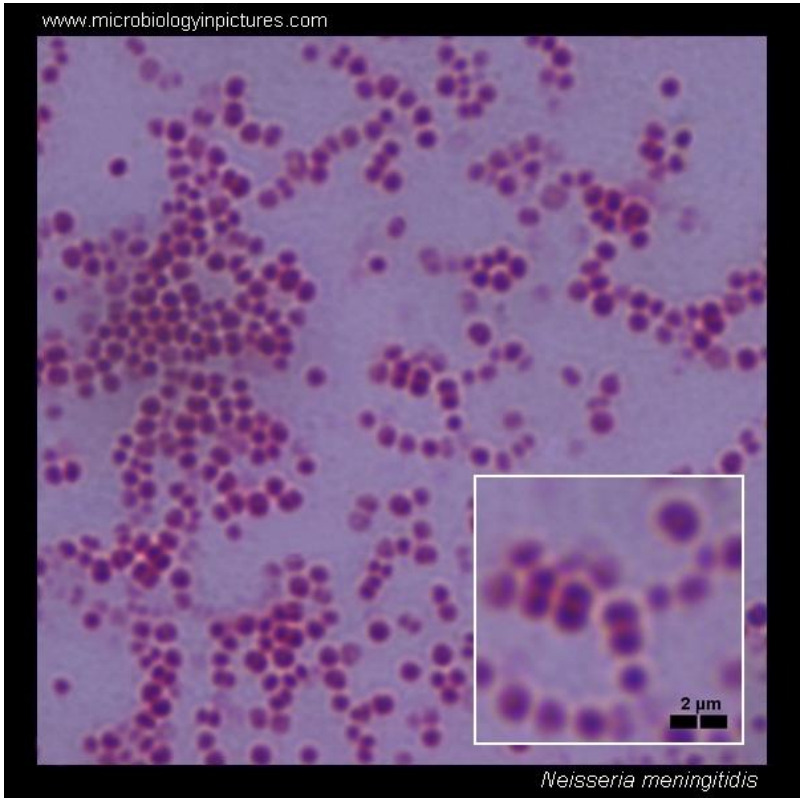


Fimbrie (pili)



Mikroskopie neisserií
Neisseria meningitidis

- Gram negativní diplokoky tvaru „kávového zrna“

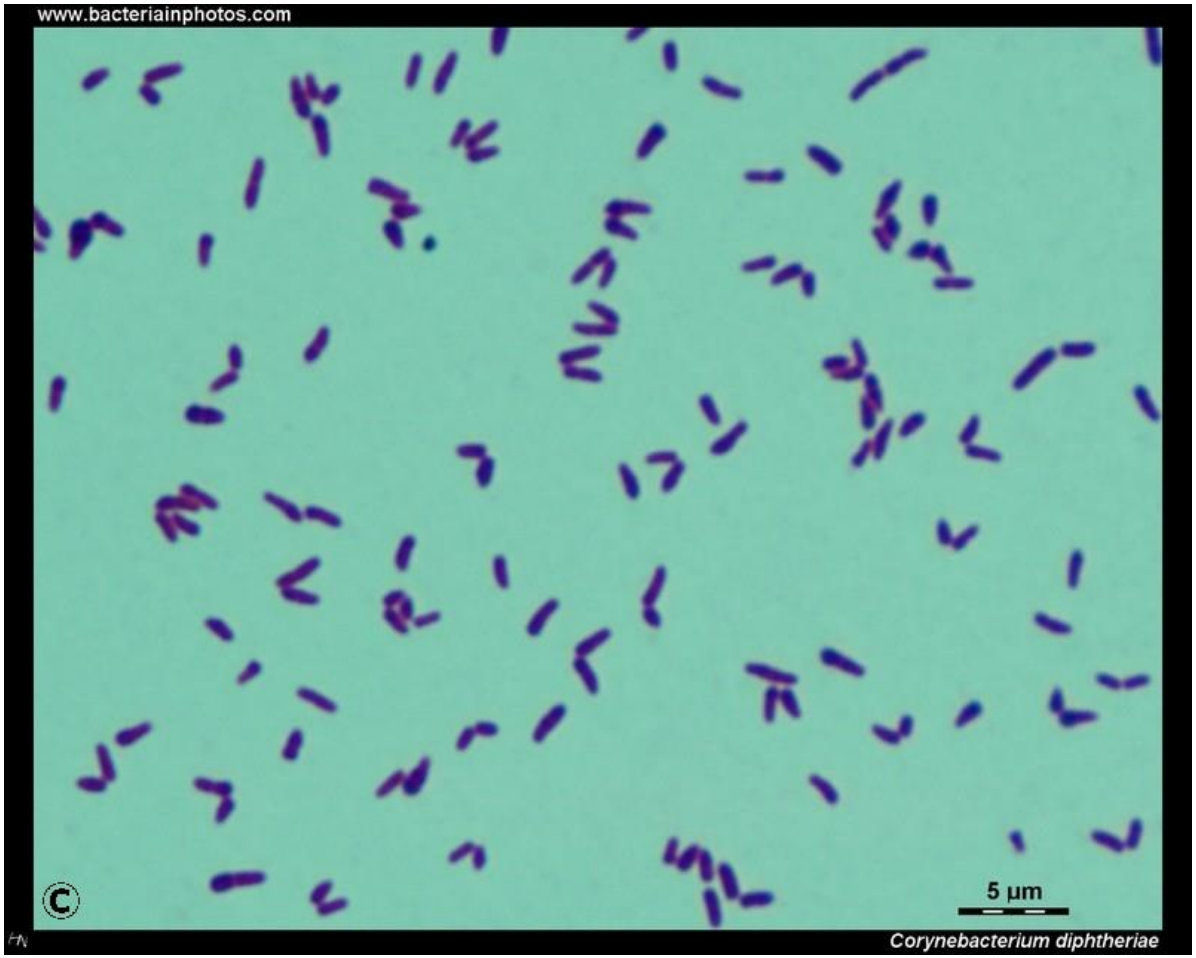


PRAKTICKÁ ČÁST

3. IDENTIFIKACE KORYNEBAKTERIÍ

Mikroskopie korynebakterií

- Gram pozitivní (modré) tyčinky



Mikroskopie neisserií, korynebakterií - Gramovo barvení

- Pomůcky: kultury *Neisseria sp., Corynebacterium sp.*
- Postup: Do středu podložního skla naneseme kapku fyz. roztoku a sterilní kličkou v ní resuspendujeme malé množství kultury;
- Po zaschnutí fixujeme metanolem (vložíme do nádobky s metanolem a fixujeme 5 minut);
- Po opláchnutí sklíčka pokryjeme nátěr roztokem krystalové violeti po dobu 15-20 sekund;
- Po opláchnutí vodou převrstvíme preparát Lugolovým roztokem (20 sekund) a opět opláchneme vodou;
- Preparát odbarvujeme alkoholem tak dlouho, dokud odtéká barva, poté dobarvíme karbolfuchsinem (20 sekund), opláchneme a necháme oschnout;
- Na usušený nátěr kápneme imerzní olej a mikroskopujeme (bez krycího sklíčka!) za použití **imerzního objektivu** (zvětšení 10×100).

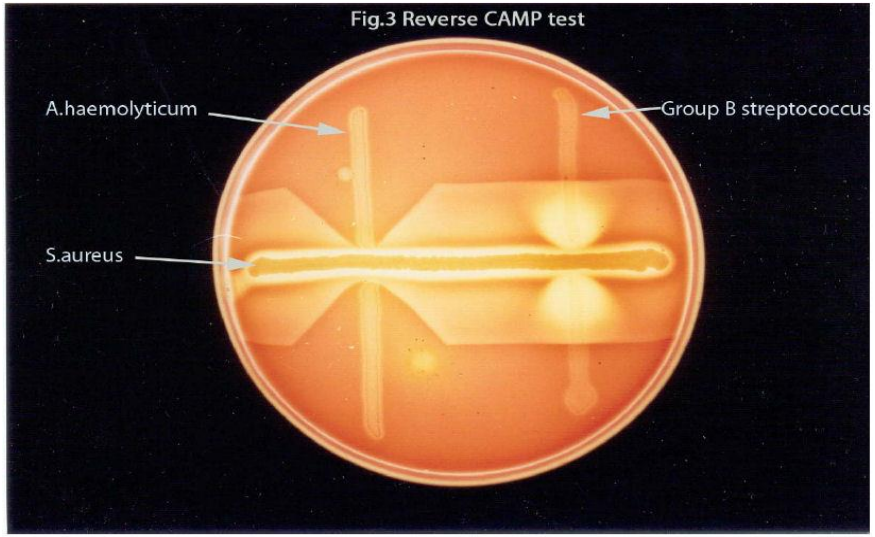
Inverzní/reverzní CAMP test

Princip: Kmen produkující fosfolipázu D inhibuje stafylokokový β-hemolyzin a redukuje či úplně ruší vliv β-hemolyzinu na krvinky.

Reverzní CAMP test je pozitivní u druhu *Arcanobacterium haemolyticum, Corynebacterium ulcerans* a *C. pseudotuberculosis*

Postup:

Na krevní agar čarou naočkujeme test. kmen a kolmo na něj čarou *Staphylococcus aureus.*



PRAKTICKÁ ČÁST

1. IDENTIFIKACE HEMOFILŮ - HODNOCENÍ

Kultivace hemofilů - hodnocení

Vyhodnocení:

1. posuzujeme růst obou kmenů na MH agaru v okolí disků s růstovými faktory

(HAIN – potřebuje faktor X a V; HAPA – faktor V)

2. posuzujeme nárůst hemofilů v okolí stafylokokové čáry

Všechny výsledky popíšeme a zakreslíme do protokolu.

PRAKTICKÁ ČÁST

2. IDENTIFIKACE NEISSERIÍ - HODNOCENÍ

Mikroskopie neisserií/korynebakterií – hodnocení

Vyhodnocení:

každý student do protokolu zaznamená mikroskopické znaky vybraného mikroba, tj. tvar buněk, barvitelnost dle Grama (Gram pozitivní, Gram negativní), uspořádání buněk

Oxidázový test

- **Princip:** Testem prokazujeme přítomnost cytochromoxidázy barevnou reakcí N,N-dimetyl – 1,4-fenylendiaminu s α-naftolem za vzniku indolfenolové modři.
- **Pomůcky:** kultura neisserií, proužky OXI testu
- **Pracovní postup:** zónu testovacího proužku otiskneme přímo na testované kolonie v kultivaci
- **Vyhodnocení:** odečítáme barevnou reakci

  <u>pozitivní</u>: do 30 sec. intenzivně modrá

  <u>opožděně pozitivní</u>: do 2 min. intenzivně modrá

  <u>negativní</u>: beze změny, popř. reakce až po 2 min.

PRAKTICKÁ ČÁST

3. IDENTIFIKACE KORYNEBAKTERIÍ - HODNOCENÍ

Inverzní CAMP - hodnocení

Vyhodnocení:

- pozitivní test se projeví potlačením β-hemolýzy testovaným kmenem v místě křížení očkovacích čar s kmenem *Staphylococcus aureus*
- výsledek kultivace vyhodnotíme a pozorování popíšeme a zakreslíme do protokolu
- *Arcanobacterium haemolyticum* – pozitivní iCAMP
  Corynebacterium ulcerans – pozitivní iCAMP
  Corynebacterium diphtheriae – negativní iCAMP

PRAKTICKÁ ČÁST

4. IDENTIFIKACE LISTERIA MONOCYTOGENES

Listeria monocytogenes

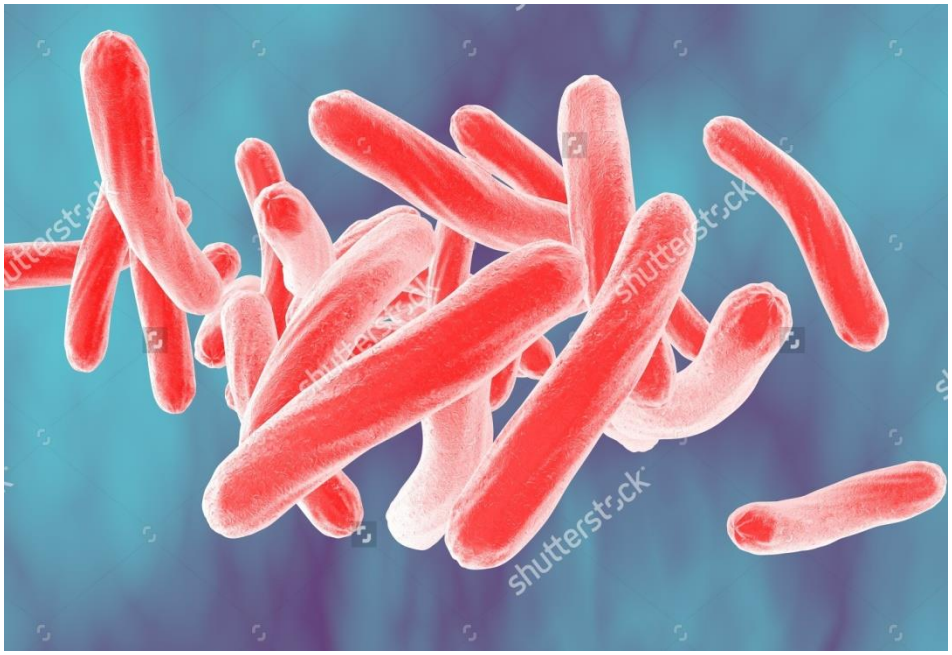
- **Princip:** *L. monocytogenes* je pohyblivá při kultivaci do 25°C. Typický kotrmelcový pohyb je možno pozorovat v nativním preparátu.
- **Pomůcky:** bujónová kultura listerií, podložní a krycí sklíčka, mikroskop
- **Postup:** na podložní sklíčko kápneme kapku kultury, přikryjeme krycím sklíčkem, pozorujeme při 40x zvětšení

PRAKTICKÁ ČÁST

4. IDENTIFIKACE MYKOBAKTERIÍ

Mikroskopie mykobakterií

- barvení dle Ziehl-Neelsena
- barvení acidorezistentních tyčinek



Barvení dle Ziehl – Neelsena

(barvení za tepla)

Barvení acidorezistentních tyčinek

Postup:

- koncentrovaný karbolfuchsin
- zahřívání barvy plamenem 3x do výstupu par
- slijeme barvu, odbarvení **kyselým alkoholem!**
- oplach vodou
- malachitová zeleň
- oplach vodou a sušení preparátu

Kultivace mykobakterií

<u>Kultivační půdy:</u>

- pevné vaječné půdy ve zkumavce
- určeny pro dlouhodobou kultivaci

po dobu 6 – 9 týdnů

Lôwenstein – Jensenova půda

Ogawova půda