



ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVLJE SOMBOR

**NACIONALNA REFERENTNA LABORATORIJA
ZA MENINGOKOK I HEMOFILUS**

Deo NRL za Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae i Haemophilus influenzae

UPUTSTVA

januar 2015.

Sadrži informacije o referentnim uslugama za:

- ◆ fenotipsku karakterizaciju izolata *Neisseria meningitidis*
- ◆ fenotipsku karakterizaciju izolata *Haemophilus influenzae*
- ◆ detekciju polisaharidnog antigena *Neisseria meningitidis* i kapsularnog antigena *Haemophilus influenzae*
- ◆ PCR detekciju genomske DNK *Neisseria meningitidis* i genomske DNK *Haemophilus influenzae* iz nekultivabilnih uzoraka (primarno sterilne tečnosti)
- ◆ Molekularnu tipizaciju izolata u cilju javno-zdravstvenog nadzora

Adresa: Nacionalna referentna laboratorija za meningokok i hemofilus
Zavod za javno zdravlje – Sombor
Vojvodanska 47
25000 Sombor
SRBIJA

Telefon: 00381(0)25/444-853
Fax: 00381(0)25/412-888
Radno vreme: ponedeljak – petak: 07-14:30h; subota: 07-12h
Kontakt telefon za pozive van radnih sati: 00381(0)63/468-069 Davor Čulić
00381(0)63/468-113 Snežana Delić

Web: <http://www.zzjzsombor.org/referentna-laboratorija-za-hemofilus-i-meningokok/>

E-mail: mikrobiologija.sombor@gmail.com

Rukovodilac RL:

dr med. Snežana Delić
spec. mikrobiologije sa parazitologijom
subspecijalista kliničke mikrobiologije

Odgovorna osoba RL:

Davor Čulić
dipl. molekularni biolog i fiziolog

Odgovorni tehnolog RL:

Ivona Popović
strukovni medicinsko-laboratorijski tehnolog

SADRŽAJ

UVOD	4
DEFINICIJE SLUČAJA / CASE DEFINITONS	5
UPUTSTVO ZA ČUVANJE I TRANSPORT <i>N. meningitidis</i> i <i>H. influenzae</i>	7
STANDARDNA OPERATIVNA PROCEDURA ZA SKRINING ZA MENINGOKOKE	9
BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE RODA <i>Neisseria</i> (<i>identifikacija N. meningitidis</i>)	13
STANDARDNA OPERATIVNA PROCEDURA ZA SKRINING NA <i>H. influenzae</i>	16
BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE RODA <i>Haemophilus</i> (<i>identifikacija H. influenzae</i>)	19

UVOD

Poštovane kolegice i kolege,

Rešenjem broj: 022-04-28/2008-07 Ministarstva zdravlja Republike Srbije i Projekta „Unapređenje laboratorijskih usluga u Srbiji“ (EAR, Eptisa), mikrobiološka laboratorija ZZJZ Sombor proglašena je za **NACIONALNU REFERENTNU LABORATORIJU ZA MENINGOKOK I HEMOFILUS**.

Finansijska sredstva za rad Referentnih laboratorija predviđena su finansijskim planom Ministarstva zdravlja za 2009. godinu, a pred nama je težak i mukotrpan posao organizovanja i početka rada laboratorije.

Molimo Vas da nam šaljete:

1. Sojeve *Neisseria meningitidis* iz primarno sterilnih tečnosti (krv, likvor, sinovijalna tečnost, pleuralni aspirat, biopsati unutrašnjih organa i dr.)
2. Sojeve *Haemophilus influenzae* iz primarno sterilnih tečnosti (krv, likvor, sinovijalna tečnost, pleuralni aspirat, biopsati unutrašnjih organa i dr.), izolate kod epiglotitisa...

U prilogu se nalaze uputnice gde se unose podaci o pacijentu, materijal iz koga je soj izolovan, dijagnoza, prethodna antibiotska terapija, podaci o vakcinaciji (vakcina za *H. Influenzae* uvedena je 2006. godine) i dr. Formulari su napravljeni po ugledu na Referentne laboratorije istog tipa u HPA (Health Protection Agency; UK) i molimo Vas da nam, ako je moguće, dostavite sve podatke, jer su oni dragoceni za naš rad.

Takođe, napravili smo uputstva za pakovanje i kratkotrajno čuvanje i slanje materijala u Referentnu laboratoriju. Sve dodatne informacije, kao što su: preporuke za minimalne nivoe identifikacije ovih bakterija koje bi trebalo da radi svaka laboratorija, istraživanje meningokoknog kliconoštva, uputstva i članke EMGM (European Monitoring Group for Meningococci) i WHO, naći ćete na našem sajtu u delu Referentna laboratorija: <http://www.zzjsombor.org/referentna-laboratorija-za-hemofilus-i-meningokok/>.

Unapred se zahvaljujemo na razumevanju, Vašem vremenu i trudu koje je potrebno da bi se sojevi čuvali i slali. Obzirom da se radi o vrlo osetljivim bakterijama, molimo Vas da NAS ODMAH OBAVESTITE KADA IMATE IZOLATE OVIH BAKTERIJA da bi se o svim detaljima i eventualnim pitanjima dogovorili.

O rezultatima ispitivanja (kada budu objavljena) bićete obavešteni e-poštom ili u pisanom obliku.

DEFINICIJE SLUČAJA / CASE DEFINITIONS

Definicije preuzete iz: 2008 EU Case Definition (2008/426/EC) for meningococcal disease, invasive (ECDC-European Centre for Disease Prevention and Control)

MENINGOKOKNA BOLEST, INVAZIVNA (*NEISSERIA MENINGITIDIS*)

Klinički kriterijumi

Osoba koja ispunjava najmanje jedan od sledećih pet:

- groznica
- meningealni znaci
- petehijalni raš
- septički šok
- septički artritis

Laboratorijski kriterijumi

Najmanje jedan od sledeća četiri:

- Izolacija *Neisseria meningitidis* iz normalno sterilnog mesta, uključujući lezije na koži (purpura)
- Detekcija nukleinske kiseline *Neisseria meningitidis* iz normalno sterilnog mesta, uključujući lezije na koži (purpura)
- Detekcija antigena *Neisseria meningitidis* u CST
- Detekcija gram negativnih diplokokala u bojenom preparatu CST

Epidemiološki kriterijumi

Epidemiološka veza sa humanom (čovjek-čovjek) transmisijom

Klasifikacija slučajeva

A. Mogući slučaj: svaka osoba koja ispunjava kliničke kriterijume

B. Verovatan slučaj: svaka osoba koja ispunjava kliničke kriterijume i sa epidemiološkom povezanošću

C. Potvrđen slučaj: svaka osoba koja ispunjava laboratorijske kriterijume

BOLEST UZROKOVANA HAEMOPHILUS INFLUENZAE, INVAZIVNA (*Haemophilus influenzae*)**Klinički kriterijumi**

Nije relevantno za svrhe nadzora

Laboratorijski kriterijumi

Laboratorijski kriterijumi za definiciju slučaja

Najmanje jedan od sledeća dva:

- Izolacija *Haemophilus influenzae* iz normalno sterilnog mesta
- Detekcija nukleinske kiseline *Haemophilus influenzae* iz normalno sterilnog mesta

Tipizaciju izolata bi trebalo primeniti, uvek kada je moguće.

Epidemiološki kriterijumi: Nije dostupno

Klasifikacija slučajeva:

A. Moguć slučaj: nije dostupno

B. Verovatan slučaj: nije dostupno

C. Potvrđen slučaj: svaka osoba koja ispunjava uslove za laboratorijsku potvrdu slučaja

LITERATURA:

- http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/eu_ibd/pages/case_definition.aspx

UPUTSTVO ZA ČUVANJE I TRANSPORT *NEISSERIA MENINGITIDIS* I *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* SOJEVA

LITERATURA:

Laboratory Manual for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* (prevedeno poglavlje VIII). WHO/CDS/CSR/EDC/99.7

Da bi potvrdili identifikaciju izolata i uradili ispitivanje antimikrobne osetljivosti uzročnika bakterijskih meningitisa, neophodno je sačuvati i transportovati soj u nacionalnu i/ili Referentnu laboratoriju WHO.

N. meningitidis, *S. pneumoniae* i *H. influenzae* su osetljive bakterije i moraju se čuvati i transportovati pažljivo.

1. KRATKOTRAJNO ČUVANJE

Vijabilnost u toku kratkotrajnog čuvanja (jedna nedelja ili manje) je najbolja ako se *S. pneumoniae* i *H. influenzae* inokulišu na ukošeni čokoladni agar u epruvete sa navojima, inkubiraju preko noći na 35°C, a nakon toga održavaju na 4°C. Ove bakterijske vrste ne preživljavaju dobro u tečnim podlogama, preživljavaju jedino 3-4 dana na primarnim agar pločama. Kod čuvanja *N. meningitidis* čvrsti zatvarači sa navojima mogu se olabaviti, ali su dostupne komercijalne epruvete sa permeabilnom membranom na čvrstom zatvaraču, koja dopušta izmenu gasova (Biomedical Polymers, Leominster, MA) i treba je koristiti, ako je moguće. Prelivanje kosine sa TSB (triptikaza soja bujon) može biti od pomoći i može produžiti vijabilnost *N. meningitidis* do 14 dana. Ukošeni čokoladni agar zasejan sa *N. meningitidis* ne čuvati u frižideru ili zamrzivaču.

B. DUGOTRAJNO ČUVANJE

Radi Referentna laboratorija.

C. TRANSPORT KULTURA

Liofilizovane kulture i ukošeni čokoladni agar mogu biti transportovani bez rashlađivanja. Kulture bi trebalo pakovati prema regulativama navedenim u WHO Laboratory Biosafety Manual. Svaka bočica ili epruveta treba da bude pojedinačno zapakovana pre nego što bude zatvorena u metalni kontejner, uključujući absorbent.

Na transportnom kontejneru, na etiketi, treba da bude napisana adresa, kao i upozorenje o etiološkom agensu. U pojedinačno pakovanje ne stavljati više od 50 ml kulture.

C1. Transport u silika gel pakovanjima

N. meningitidis, *S. pneumoniae* i *H. influenzae* mogu biti uspešno transportovane u silika gel pakovanjima, koja su jeftina i laka za upotrebu.

- Zasejati bakterije na krvnu gar ploču (BAP) ili čokoladni agar (CAP). Inkubirati ploče na 35°C, 18 - 20 časova u CO₂ atmosferi. Proveriti da li je porasla kultura čista.
- Pokupiti sterilnim brisom sav porast sa ploče.
- Rezanjem otvoriti silika gel pakovanje i staviti bris u njega. Saviti uglove i pričvrstiti silika gel pakovanje sa trakom (selotejpom). Obeležiti silika gel pakovanje odgovarajućim identifikacionim brojem.
- Kada se brisevi u silika gel pakovanjima čuvaju na 4°C, *N. meningitidis* može da preživi najviše 3 nedelje, a *H. influenzae* i *S. pneumoniae* najviše 2 nedelje. Na sobnoj temperaturi *N. meningitidis*, *H. influenzae* i *S. pneumoniae* mogu da prežive 2 nedelje (u silika gel pakovanju).

NAPOMENA REFERENTNE LABORATORIJE:

Ovo je izvorno prevedeni deo laboratorijskog priručnika o pakovanju i transportu ovih bakterija.

Laboratorije koje se nalaze u zavodima za javno zdravlje, a rade kliničku mikrobiologiju, verovatno već imaju transportne podloge ili mogu da ih naruče (postoje stavke u budžetskim sredstvima za pakovanje, slanje i transport materijala u Referentne laboratorije). Takođe, trostruka pakovanja za slanje materijala se mogu dobiti (u ograničenom broju) u IZJZ Srbije „dr Milan Jovanović Batut“. U slučaju potrebe i RL Sombor Vam može dostaviti ograničen broj ovih transportnih briseva.

Način slanja:

Naša preporuka je da se uradi prethodno opisani postupak i izolat stavi u Amies transportni medijum, koji ćete nakon toga dobro zatvoriti i zapakovati.

Uzorke slati DHL transportnom službom ili službenim autom (propisno obezbeđen).

U slučaju nekih nejasnoća ili pitanja:

MOLIMO VAS DA NAS KONTAKTIRATE PRE SLANJA SVAKOG IZOLATA DA BI SE PRECIZIRALO VREME I NAČIN TRANSPORTA.

STANDARDNA OPERATIVNA PROCEDURA ZA SKRINING NA MENINGOKOKE

- tipovi uzoraka : nazalni, pernazalni i orofaringealni.

1. OPSEG DOKUMENTA

Ova standardna operativna procedura opisuje ispitivanje uzoraka za dijagnostički skrining na *Neisseria meningitidis*, u slučajevima meningokokne bolesti. Ona može biti korišćena kao skrining za slučajeve kontakta posle konsultacije sa lokalnim epidemiološkim timom ili osobljem Referentne laboratorije.

2. UVOD

Neisseria meningitidis je deo normalne flore nazofarinksa. Transmisija sa osobe na osobu je jedini poznati put prenošenja i obično se vrši preko kapljica aerosola ili sekreta iz gornjeg respiratornog trakta asimptomatskog kliconoše ili putem bliskog kontakta sa obolelim od invazivne meningokokne bolesti.

Većina slučajeva (97%) meningokokne bolesti koje se javljaju su sporadične, a bliski kontakti sa obolelim povećavaju rizik od infekcije (UK).

Da bi se sprečila dalja transmisija virulentnih meningokoka, za takve kontakte preporučena je profilaksa (antibiotska hemoprofilaksa i vakcinacija, ako je potrebno). Cilj je da se spreči prenos virulentnih organizma od početnog slučaja. PHE preporučuje da nazofaringealni brisevi se prikupljaju od svih sumnjivih slučajeva, što se naznači na uputnici. NICE vodič ne preporučuje korišćenje nazofaringealnih briseva kod dece mlađe od 16 godina. Ispitivanje kliconoštva spada u domen epidemioške službe i javnog zdravlja.

Karakterizacija organizma koji je izazvao oboljenje značajan je ekvivalent u menadžmentu epidemije kao određujući da li slučajevi mogu biti povezani ili ako je vakcinacija kontaktnih slučajeva nužna. Korišćenja intravenskih antibiotika u opštoj populaciji pre hospitalizacije može smanjiti procenat detekcije *N. meningitidis* iz krvi i CST; prethodna antibiotska terapija smanjuje mogućnost izolacije meningokoka iz nazofaringealnih briseva (u 40 – 50 % kliničkih slučajeva).

Potvrda meningokokne bolesti putem molekularnih metoda moguća je i u slučajevima kada ne postoje izolati za tipizaciju ali ne omogućava određivanje osetljivosti soja na antibiotike.

Izolacija meningokoka iz dijagnostičkog ili skrining brisa obolelog ili bliskog kontakta neophodna je radi identifikacije soja.

Tipizacija je važna za istraživanje i nadzor nad epidemijama, kod nacionalnih programa vakcinacije za serogrupu C meningokoka (za sada) i za detekciju neupeha vakcinacije.

3. KLICONOŠTVO

N. meningitidis se kod kliconoša nalazi na zadnjem faringealnom zidu i može biti detektovana iz pernazalnih ili orofaringealnih briseva. Uzorci za skrining na meningokoke mogu poticati od: inficiranih osoba koje su možda lečene penicilinom ili nelečenih asimptomatskih pacijenata koji su imali kontakta sa indeksnim slučajem (index case). Orofaringealni brisevi (uzeti sa zadnjeg faringealnog zida kroz usta) su idealni, ali pernazalni brisevi su takođe prihvatljivi kada su pacijenti nesposobni za saradnju.

Stepen kliconoštva u ukupnoj populaciji je procenjen na oko 10% (UK). Ono može biti znatno veće kod tinejdžera (25%) i mladih (32%); verovatno kao rezultat povećane socijalne aktivnosti koja uključuje inhalaciju infektivnog respiratornog sekreta i direktnog kontakta (ljubljenje).

Stepen klinoštva može biti takođe viši u slučajevima bliskih kontakata sa obolelim, u zatvorenim i poluzatvorenim kolektivima, kao što su vojne ustanove, kampovi i tokom velikih javnih okupljanja (hodočašća) i naročito tokom epidemije. Oštećenje nezofaringealne mukoze (pušenje i pasivno pušenje) i koinfekcija sa virusom gripa i nekim vrstama mikoplazmi mogu da povećaju rizik od sticanja kliconoštva. Hemoprofilaksa se daje osobama koje su bile u bliskom produženom kontaktu sa obolelim (domaćinstvo, porodica) i onima koji su imali tranzitorni bliski kontakt, a bili su izloženi infektivnim respiratornim sekretima u vreme inicijalne hospitalizacije obolelog.

4. SPEKTAR BOLESTI

Infekcija sa *N. meningitidis* produkuje širok spektar bolesti koje se manifestuju od blagog obolenja sa tranzitornom groznicom i bakterijemijom do fulminantne meningokokne sepse, koja se karakteriše progresivnim proširenim purpurnim kožnim rašom, defektima koagulacije, septičkim šokom i smrću unutar nekoliko časova od početka simptoma. Druge prezentacije uključuju meningitis koja može ili ne mora biti praćen purpurnim rašom, primarni meningokokni artritis, pneumoniju, konjunktivitis, i vrlo retko sinuzitis, endokarditis i nekrotizirajući fascitis. Ponekad postoji slika hronične bakterijemije; (pozitivna hemokultura , kožne lezije i artritis).

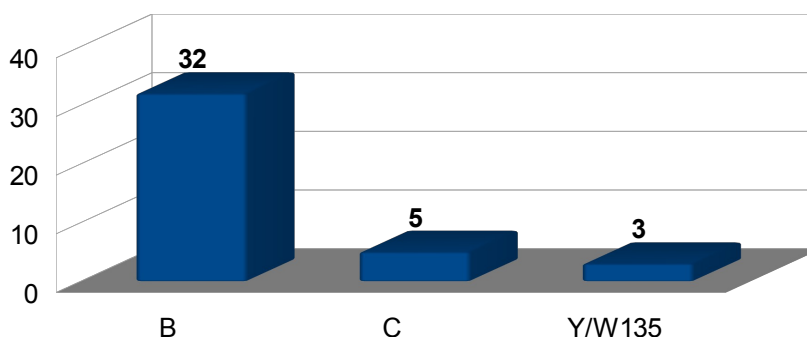
N. meningitidis može biti izolovana iz donjeg genitalnog trakta ili rektuma u muškaraca i žena u toku skrininga na gonoreju i mogu implicirati infekciju genitalnog trakta. Retke deficijencije u kasnim stupnjevima puta komplementa i properdina (ili tretman koji inhibira sistem komplementa) mogu biti predisponirajuće za rekurentne infekcije sa neuobičajenim serogrupama meningokoka, NG meningokokama i drugim najserijama i

moгу se prezentovati kao meningokokna bolest.

Diseminovana meningokokna infekcija, iako retka, mođe se javiti kod pacijenata obolelih od HIV-a.

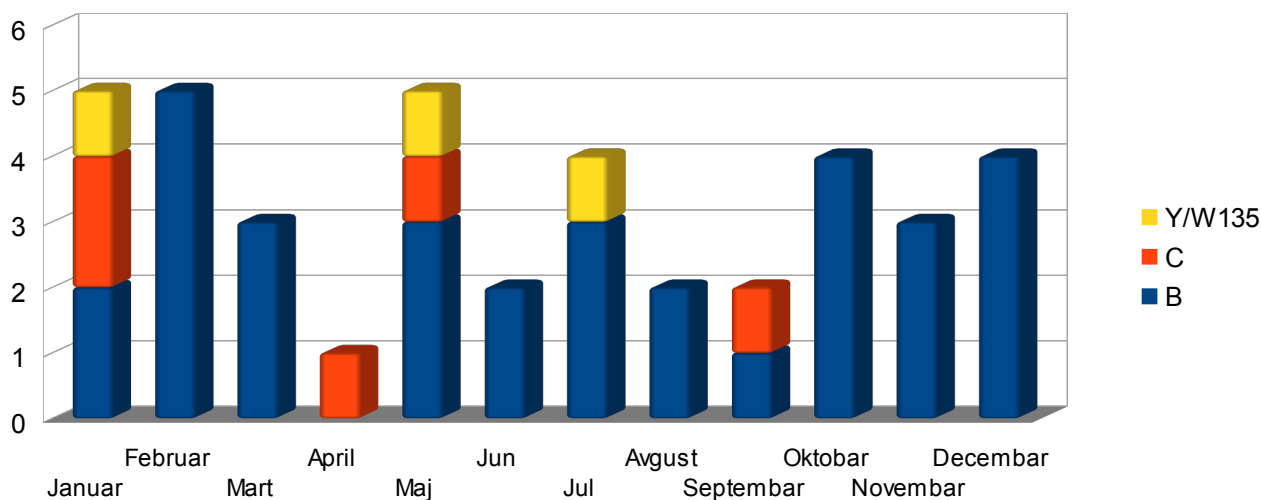
5. EPIDEMIOLOGIJA

Meningokokna bolest se javlja širom sveta. Identifikovano je trinaest serogrupa (na osnovu jedinstvenih kapsuliranih polisaharida), od kojih šest prouzrokuje većinu infekcija (A, B, C, W135, X i Y). U Velikoj Britaniji najčešća je serogrupa B, a zatim sledi serogrupa C meningokoka. Učestalost invazivne serogrupe Y u Velikoj Britaniji porasla je u poslednjih nekoliko godina. Pokazano je da je prirodni imunitet u populaciji na meningokoke grupe W135 i Y nizak u svim starosnim grupama.



Grafikon br. 1: Ukupan broj izolata *N. meningitidis* po serogrupama (Srbija; 2009.-2014.)

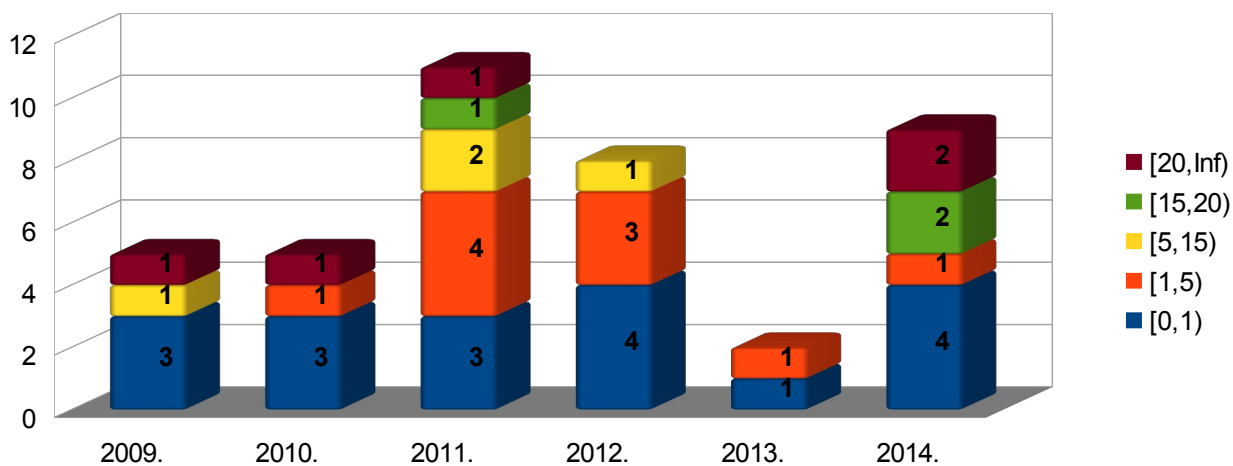
Incidenca i smrtnost je viša u odojčadi starosti do jedne godine života, u kojih znaci rane infekcije mogu biti znatno teži za prepoznavanje. Drugi, ali niži pik infekcija je u dobnoj grupi od 15 do 24 godine, a sezonski pik se



Grafikon br. 2: Broj i raspored izolata *N. meningitidis* po mesecima (Srbija; 2009.-2014.)

beleži u zimskim mesecima.

Klinički detalji / uslovi	Standardni medijum	Inkubacija			Pregled kulture	Ciljni organizam
		Temperatura (°C)	Atmosfera	Vreme		
Skrining na <i>N. meningitidis</i> slučaj ili kontakt	GC selektivni agar	35 - 37	5 - 10% CO ₂	40 - 48h	dnevno	<i>N. meningitidis</i>



Grafikon br. 3: Broj izolata po starosnim grupama (Srbija; 2009.-2014.)

6. LITERATURA

1. Delovi preuzeti iz: Health Protection Agency, UK: National Standard Methods BSOP 51 [B 51i2 March 2014 \(PDF, 921 KB\)](#); www.evaluations-standards.org.uk

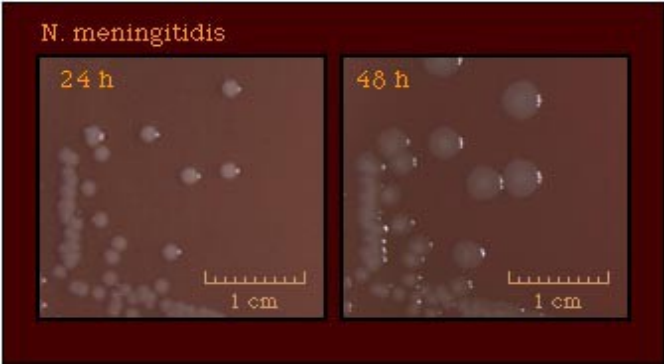

BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE RODA *Neisseria*
(identifikacija *N. meningitidis*)




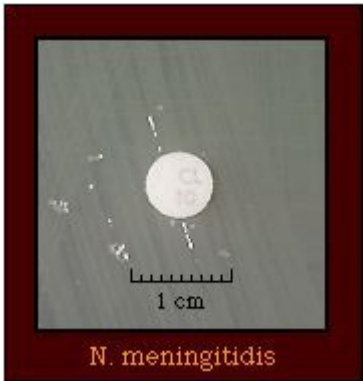
UVOD

Prvobitna uloga ovog teksta je da ukaže na karakteristike *N. meningitidis*, koje mogu pomoći u diferenciranju između ove i drugih vrsta bakterija ovog roda koje proizvode kiselinu iz glukoze i maltoze.

Tekst pruža informacije za preciznu identifikaciju *N. meningitidis* i u tome koristi standardne testove za identifikaciju ove vrste, informacije o vrstama koje se mogu pogrešno identifikovati kao *N. meningitidis*, i dodatne testove koji se mogu uraditi radi precizne identifikacije gram-negativnih, oksidaza-pozitivnih diplokoknih vrsta.

Tabela 1. Karakteristike *N. meningitidis*

Karakteristike Bojenje po Gramu morfologija ćelije	Ilustracija Gram-negativne diplokoke
Morfologija kolonije	 <p style="text-align: center;"><i>N. meningitidis</i></p> <p style="text-align: center;">24 h 48 h</p> <p style="text-align: center;">1 cm 1 cm</p>
Pigmentacija	 <p style="text-align: center;"><i>N. meningitidis</i></p> <p style="text-align: center;">24 h 48 h</p>

<p>Oksidaza test</p>	 <p>N. meningitidis: Oxidase-positive</p>
<p>Superoxol test Reakcija sa 30% vodonik peroksidom</p>	 <p>N. meningitidis Superoxol</p> <p>GC II base medium + 1% IsoVitalex Slide</p> <p>Postoji razlika među sojevima od slabe (1+) do jake (4+)</p>
<p>Katalaza test Reakcija sa 3% vodonik peroksidom</p>	 <p>N. meningitidis Catalase-Positive</p> <p>GC II base medium+ 1% IsoVitalex Slide</p>
<p>Rezistencija na kolistin</p>	 <p>N. meningitidis</p>

Različite *Neisseria* vrste mogu biti pogrešno identifikovane kao *N. meningitidis* u testovima detekcije kiseline. Pomoćni testovi se koriste da bi se pravilno diferencirale te vrste.

Tabela 2. Diferencijalne karakteristike *Neisseria spp.* koje proizvode kiselinu iz glukoze i maltoze

Species	Produkcija kiseline					Enzim supstratni test	Polisaharid iz saharoze	Pigment	Rezistencija na kolistin
	G	M	S	F	L				
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-	-	Gamaglutamil-aminopeptidaza pozitivna	-	-	R
<i>N. polysaccharea</i>	+	+	-	-	-	Hidroksipropil-aminopeptidaza pozitivna	+	-	(R)
<i>N. subflava</i> Biovar subflava Biovar flava*	+	+	-	-	-	Hidroksipropil-aminopeptidaza pozitivna ili gamaglutamil-aminopeptidaza pozitivna	-	+	(R)
Laktoza-negativna <i>N. lactamica</i> **	+	+	-	+/-	-	Beta-galaktozidaza pozitivna	-	-	R

* *N. subflava* biovar flava može biti identifikovana kao *N. subflava* biovar subflava ako nije utvrđena produkcija kiseline iz fruktoze.

** autor teksta naišao je na jedan primer laktoza - negativne vrste *N. lactamica*; ova vrsta je identifikovana pomoću enzim supstratnog testa koji je pokazao da bakterija proizvodi beta – galaktozidazu.

STANDARDNA OPERATIVNA PROCEDURA ZA SKRINING NA *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

UVOD-Taksonomija

Postoji trinaest vrsta roda *Haemophilus*. Vrste koje se vezuju za ljude su: *H. influenzae*, *H. aegyptius*, *H. haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *H. pittmaniae*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus* i *H. ducreyi*. Studije homologije, hibridizacijom nukleinskih kiselina i 16S rRNK, ukazuju da *H. ducreyi* ne pripada rodu *Haemophilus*, već da je član porodice Pasteurellaceae.

Postoji osam biotipova *Haemophilus influenzae* (I-VIII), i osam biovarijeteta *H. parainfluenzae* (I-VIII). Pittman opisuje šest antigen različitih kapsularnih tipova *H. influenzae*, označenih a-f.

KARAKTERISTIKE

Haemophilus je Gram-negativna sferična, ovalna ili štapičasta ćelija manja od jednog mikrometra, varijabilne dužine, sa jasnim pleomorfizmom i ponekad formira filamente. Male, okrugle, konveksne kolonije, koje mogu biti iridescენტne, narastu za 24 sata na čokoladnom agaru. Iridescencija se primećuje kod kapsuliranih sojeva.

Sve vrste zahtevaju faktore rasta iz krvi, naročito X faktor (protoporfirin IX ili protohem) i/ili V faktor (nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) ili NAD fosfat (NADP)).

Na krvnom agaru *H. influenzae* pokazuje satelitizam oko kolonija *Staphylococcus aureus* (izvor V faktora). Ugljeni hidrati se katabolišu uz produkciju kiseline. Nekoliko vrsta proizvodi gas. Optimalna temperatura za rast je 35-37 °C. Ove vrste su fakultativni anaerobi i nepokretne su. Redukuju nitrata u nitite.

Principi identifikacije

Kolonije na krvnom ili čokoladnom agaru prvenstveno mogu biti identifikovane na osnovu morfologije kolonija, hemolize i zahteva za X i V faktorima i CO₂. Test sinteze porfirina (ala test) može se koristiti u diferencijaciji hem produkujućih *Haemophilus* vrsta. Identifikacija se obavlja komercijalnim biohemijskim testovima, serotipizacijom sa tip specifičnim antiserumom i/ili slanjem u referentnu laboratoriju. Izolate *H. influenzae* iz primarno sterilnih mesta treba slati u Referentnu laboratoriju za hemofilus, Zavod za javno zdravlje – Sombor, na konfirmaciju i tipizaciju.

IDENTIFIKACIJA

Mikroskopski preparat

Bojenje po Gramu

Haemophilus vrste su mali kokobacili ili duže štapićaste Gram-negativne ćelije, različite dužine sa vidljivim pleomorfizmom koji ponekad formiraju filamente. Drugi HACEK mikroorganizmi su sferične, ovalne ili štapićaste Gram-negativne ćelije koje mogu da variraju u dužini sa pleomorfizmom i formiranjem filamenata.

Medijum za primarnu izolaciju:

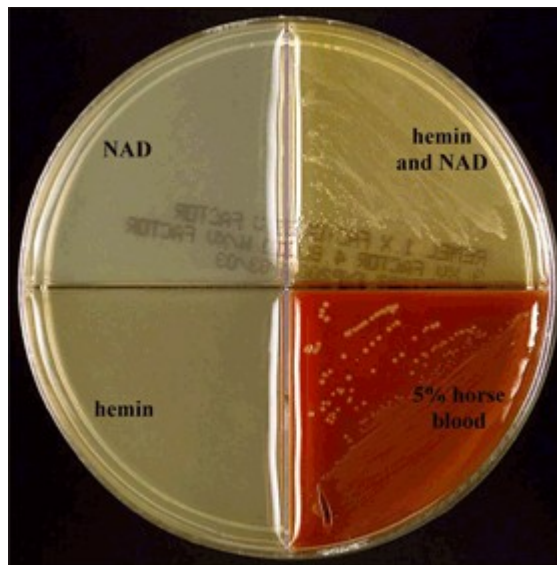
Čokoladni agar inkubiran u 5-10% CO₂, na 35-37°C, 16-18 sati

Krvni agar inkubiran u 5-10% CO₂, na 35-37°C, 16-18 sati.

Izgled kolonija

Haemophilus vrste su male, okrugle, konveksne kolonije, koje mogu biti iridescentne i koje rastu na čokoladnom agaru nakon inkubacije od 24 sata. *H. influenzae* daje satelitske kolonije oko kolonija *St. aureus* na krvnom agaru.

Morfologija kolonija ostalih HACEK organizama varira sa vrstom i medijumom za izolaciju.



Brzi test za detekciju β-laktamaza (CEF-F)



Ovaj test se koristi za detekciju prisustva bakterijskih β-laktamaza. Neke bakterije proizvode enzime kojima inaktiviraju antibiotike iz grupe β-laktama (penicilini i cefalosporini). CEF-F reagens čine diskovi sa hromogenim cefalosporinom koji daje crvenu boju usled hidrolize β-laktamazom.

Procedura: na predmetno staklo naneti nekoliko kapi fiziološkog rastvora i u njega inokulirati ezom jednu bakterijsku koloniju. U tako pripremljen inokulum staviti jedan CEF-F disk i sačekati nekoliko minuta. Soj koji proizvodi β-laktamazu daje pozitivnu reakciju tj. Disk postaje crven.

EUCAST , 2014.

Skrining test za ispitivanje rezistencije sojeva <i>H. influenzae</i> na beta-laktamske antibiotike		
- dodatna tabela -		
Benzylpenicillin (1U) disk Prečnik zone	Beta-laktamaze	Dodatna testiranja i/ili interpretacija
≥ 12 mm	Ne testirati	Izvestiti S za navedene beta laktamske antibiotike za koje su navedeni klinički “breakpoint”-i (uključujući i one sa “Note”), i oralni cefuroksim kao I, ako se izveštava.
< 12 mm	Beta-laktamaza negativan	Prisutan je drugi mehanizam rezistencije, a ne produkcija beta-laktamaza. Kako su efekti ovih mehanizama različiti na pojedinačne beta-laktamske agense, testirati osetljivost na određeni beta-laktamski antibiotik koji će imati kliničku primenu.
	Beta-laktamaza pozitivan	Za ampicilin, amoksicilin i piperacilin, izvestiti R. Za ostale beta-laktamske antibiotike, testirati osetljivost na određeni beta-laktamski antibiotik koji će imati kliničku primenu, budući da se ovim skrin testom ne mogu isključiti drugi mehanizmi rezistencije.

BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE RODA *Haemophilus*
(identifikacija *Haemophilus influenzae*)

Biohemijski testovi

Organizam	katalaza	oksidaza	ureaza
<i>H. influenzae</i>	+	+	(+) (+)
<i>H. aegyptius</i>	+	+	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+
<i>H. parainfluenzae</i>	d	+	D
<i>H. pittmaniae</i>	d	d	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	d	+	+

X i V faktori rasta – služe za diferencijaciju između *Haemophilus* vrsta

Serotipizacija *H. influenzae* se radi sa komercijalnim tip-specifičnim antiserumima.

X i V test rezultati

Organizam	X faktor	V faktor	X+V faktor	porfirin
<i>H. influenzae</i> ^a	bez porasta	bez porasta	porast	negativan
<i>H. haemolyticus</i> ^b	bez porasta	bez porasta	porast	negativan
<i>H. parainfluenzae</i>	bez porasta	porast	porast	pozitivan
<i>H. pittmaniae</i>	bez porasta	porast	porast	pozitivan
<i>H. parahaemolyticus</i>	bez porasta	porast	porast	pozitivan
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	bez porasta	porast	porast	pozitivan

^a *H. aegyptius* se ne može razlikovati od *H. influenzae* biotip III u normalnim lab. testovima

^b β-hemolitična na konjskom krvnom agaru

Biohemijski testovi

Organizam	biotip	ornitin	ureaza	indol
<i>Haemophilus influenzae</i>	I	+	+	+
	II	-	+	+
	III	-	+	-
	IV	+	+	-
	V	+	-	+
	VI	+	-	-
	VII	-	-	+
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	I	+	-	-
	II	+	+	-
	III	-	+	-
	IV	+	+	+
	V	-	-	-