

Téma P04: Diagnostika enterobakterií a bakteriálních původců gastrointestinálních infekcí

Ke studiu: *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Campylobacter*, *Helicobacter* (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									
Kultivace (KA a Endova půda) Úkol 2	Velikost KA								
	Barva KA								
	Jiné KA								
	Velikost Endo								
	Barva Endo								
	Jiné Endo								
Hajnova půda Úkol 3a									
Oxidázový test Úkol 3b									
DÍLČÍ ZÁVĚR									
Další půdy Úkol 4a	XLD agar								
	MAL agar								
	CIN agar								
Enterotest 16 (Úkol 4b)									
Antigenní analýza (Úkoly 5a a 5b)									
KONEČNÝ ZÁVĚR									

Úkol 1: Mikroskopie podezřelých kmenů

Na stole máte kmeny označené písmeny. Obarvíte je podle Grama a vepíšete výsledky do tabulky. Kmeny, které nejsou G– tyčinky, nebudou zkoumány v úkolech 3 až 5 (ale v Úkolu 2 pro srovnání s ostatními ano).

Úkol 2: Kultivace na krevním agaru a Endově půdě

Standardním způsobem popište kolonie všech kmenů na krevním agaru a Endově půdě. Pokud kmen na půdě neroste, políčko proškrtněte. Bakterie, které na žádné z obou půd nerostou a morfologicky se jeví jako zahnuté gramnegativní tyčinky, mohou být kampilobakter. Gramnegativní tyčinka, která na žádné půdě neroste, ale mikroskopicky není zahnutá, se bude probírat v příštím praktiku. Pro srovnání popište i kmen, který se morfologicky jeví jako grampozitivní kok. U stolu každý obarví jeden kmen, výsledky si vzájemně předvedte. Nátěry označte na sklíčku pomocí dermatografu příslušným písmenem.

Úkol 3: Skupinová diagnostika nejvýznamnějších na Endu rostoucích G– tyčinek

a) Odečtení zkoušky na šikmém agaru podle Hajny

Agar podle Hajny je kombinovaná diagnostická půda. V tomto úkolu nám však půjde zejména o odlišení biochemicky neaktivních, glukosu ani laktosu nefermentujících a sirovodík netvořících tyčinek – gramnegativních nefermentujících bakterií. Na Hajnově půdě jsou naočkovány všechny kmeny rostoucí na Endu. Prohlédněte výsledek. Tam, kde půda zůstala v celém rozsahu červená, jde o biochemicky neaktivní kmen – zřejmě tedy o gramnegativní nefermentující tyčinku. Tento kmen nebude testován v úkolech číslo 4 a 5.

b) Oxidázový test

Učitel demonstračně provede oxidázový test u všech G– bakterií rostoucích na Endu. Oxidázapozitivní jsou zástupci čeledi *Vibrionaceae* a některé gramnegativní nefermentující tyčinky; enterobakterie (s výjimkou plesiomonád) oxidasu nemají.

Po splnění úkolů 1 až 3 sepište **DÍLČÍ ZÁVĚR**. Které bakterie jsou enterobakterie? Další úkoly budou prováděny právě jen s enterobakteriemi.

Úkol 4: Rodové a druhové určení enterobakterií kultivačními a biochemickými testy**a) Kultivační průkaz enterobakterií na dalších půdách**

Už jste viděli výsledky kultivace na KA a Endu. Nyní si prohlédněte ještě misky s agary CIN, XLD a MAL. Popište krátce kolonie enterobakterií na těchto půdách (vyplňte do tabulky).

b) Biochemický průkaz enterobakterií

Vyhodnoťte ENTEROtest 16, který byl inkubován od předchozího dne. Zkontrolujte, zda výsledky souhlasí i s jinými testy, které jste již provedli; např. tvorba H₂S se projeví i na Hajnově půdě, yersinie rostou v typických drobných koloniích na půdě CIN, salmonely mají bledé kolonie s černým středem na půdách XLD a MAL.

U salmonel napište pouze *Salmonella* sp., jako % pravděpodobnosti uveďte součet procent všech salmonel uvedených u příslušného kódu, a index typičnosti vezměte z prvního kmene.

	ONPG	1H	1G	1F	1E	1D	1C	1B	1A	2H	2G	2F	2E	2D	2C	2B	2A
Kmen:																	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	Kód:						Identifikace						% pravd.		T index		
	ONPG	1H	1G	1F	1E	1D	1C	1B	1A	2H	2G	2F	2E	2D	2C	2B	2A
Kmen:																	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	Kód:						Identifikace						% pravd.		T index		
	ONPG	1H	1G	1F	1E	1D	1C	1B	1A	2H	2G	2F	2E	2D	2C	2B	2A
Kmen:																	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	Kód:						Identifikace						% pravd.		T index		
	ONPG	1H	1G	1F	1E	1D	1C	1B	1A	2H	2G	2F	2E	2D	2C	2B	2A
Kmen:																	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	Kód:						Identifikace						% pravd.		T index		

Úkol č. 5 Antigenní analýza v diagnostice enterobakterií

Antigenní analýzu budeme provádět pouze u těch bakteriálních kmenů, kde se provádí rutinně. Antigenní analýza je u enterobakterií prováděna především ze dvou důvodů:

- (a) odlišení antigenních typů se zvýšenou virulencí – především u *E. coli* k odlišení EPEC, popř. STEC atd.
- (b) z epidemiologických důvodů, někdy v kombinaci s důvody sub (a) – *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* atd.

a) Vyloučení EPEC

U kmene identifikovaného jako *Escherichia coli*, proveďte antigenní analýzu pomocí skličkové aglutinace se dvěma polyvalentními séry. Pokud budou obě aglutinace negativní, lze konstatovat, že kmen nepatří mezi EPEC.

b) Určení serovaru salmonely

U kmene určeného jako salmonela proveďte antigenní analýzu sklíčkovou aglutinací a zjistěte, o který serovar se jedná. Předpokládejte, že u pacienta byl již dříve nalezen kmen serovaru Enteritidis a nyní je třeba jen ověřit, zda jde opět o tento kmen. Proveďte test s antisérem proti tělovým antigenům O: 9 a bičíkovému antigenu H: g, m.

Úkol č. 6: Testy citlivosti enterobaktérií na antibiotika

Na stole naleznete difusní diskové testy citlivosti na antibiotika u kmenů, které jste určili jako Enterobacteriaceae. Do tabulky dopište zkratky antibiotik dle přiložené kartičky a pro všechny testované kmeny změřte zóny citlivosti. Na kartičce máte napsány hraniční zóny – podle nich interpretujte zóny vámi zjištěné jako citlivé (C), rezistentní (R) a dubiózní (D).

Kmen →								
Antibiotikum (celý název)	Zóna Ø (mm)	Interpr.	Zóna Ø (mm)	Interpr.	Zóna Ø (mm)	Interpr.	Zóna Ø (mm)	Interpr.

Úkol č. 7 Diagnostika kampylobakterů

Prohlédněte si kolonie bakterie, která nevyrostla na KA ani Endově půdě a kterou podle morfologie považujete za pravděpodobného kampylobaktera, na speciální půdě. Zapamatujte si čtyři základní podmínky kultivace kampylobakterů: (a) speciální půda s aktivním uhlím a s přípravkem antibiotik a antimykotik k odclonění jiných mikrobů, (b) mikroaerofilní atmosféra, (c) zvýšená teplota na 42 °C, což odpovídá tělesné teplotě ptáků coby přirozených hostitelů, a (d) prodloužení kultivace na 48 hodin. Popište kolonie a запиšte výsledek oxidázového testu, který demonstračně provede učitel. Pro kampylobaktery je typická opožděná pozitivita, tj. proužek zmodrá, ale až po chvíli, nikoli okamžitě..

Popis kolonií	Výsledek oxidázového testu	Další poznámky

Úkol č. 8: Ureázový test v diagnostice helikobaktera

V diagnostice helikobakterů se využívá mj. ureázový test, provedený přímo s bioptickým vzorkem žaludeční sliznice. Bioptát se položí na povrch půdy s ureou a indikátorem pH. V pozitivním případě půda začne poměrně rychle růžovět. Ze dvou vzorků (označených X a Y) vyberte, který je pozitivní.

Výsledek: Pozitivní je kmen ____, negativní je kmen ____.

Úkol č. 9 Diagnostika čeledi *Vibrionaceae*

Vibrionaceae je bakteriální čeleď blízka *Enterobacteriaceae*, ale oxidáza-positivní. Pro jejich kultivace užíváme speciální půdy. Vzájemné rozlišení je možné pomocí biochemických testů jako u enterobaktérií, dokonce i Enterotest 16 lze využít, pro vyhodnocení však musí být použita jiná matice. Antigenní analýza se rovněž využívá. Zakreslete, jak vibria vypadají mikroskopicky, a uveďte některé jejich vlastnosti podle prezentace, kterou vám promítá učitel.

Mikroskopie:	Nejdůležitější pevná půda pro kultivaci vibríí:	
	Nejdůležitější tekutá půda pro kultivaci vibríí:	
	Dva nejdůležitější serovary <i>V. cholerae</i>	
	Dva nejdůležitější biovary <i>V. cholerae</i> O1	

Kontrolní otázky:

1. Víte, jaký je u enterobakterií výsledek katalázového testu?
2. Z praktických důvodů tu chybí jedna půda, která se v diagnostice enterobakterií také používá – selenitový bujón. O jaký typ půdy jde a k čemu je dobrá? (Viz praktikum J03)
3. Znáte alespoň některé antigenní typy EPEC?
4. Čím by se lišilo provedení Úkolu 5b, kdyby u pacienta nebyl znám předchozí nález salmonely?
5. Který patogen především je diagnostikován Widalovou reakcí? O jaký typ reakce jde? Je přímá či ne?
6. Doporučují se antibiotika k léčbě gastrointestinálních infekcí? Proč?
7. Víte, co je ureázový dechový test a jaký je jeho princip?
8. Z kterého materiálu lze izolovat při tyfu *Salmonella* Typhi spíše než ze stolice?