

Jméno:

Kruh:

Datum:

## Diagnostika enterobakterií a bakteriálních původců gastrointestinálních infekcí

### 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									
<b>DÍLČÍ ZÁVĚR</b>									
Další půdy Úkol 4a	XLD agar								
	MAL agar								
	CIN agar								
Enterotest 16 (Úkol 4b)									
Antigenní analýza (Úkoly 5a and 5b)									
<b>KONEČNÝ ZÁVĚR</b>									

### 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. Výsledky pozorování zakreslete.

### 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 kampylobakter. Gramnegativní tyčinka, která na žádné půdě neroste, ale mikroskopicky není zahnutá, se bude probírat v příštím praktiku. Pro srovnání popište i kmen, který se

Jméno:

Kruh:

Datum:

morfologicky jevil 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<sup>-</sup> 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 oxidasový test u všech G<sup>-</sup> bakterií rostoucích na Endu. Oxidasopozitivní 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 H<sub>2</sub>S 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		
Kmen:																	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	Kód:						Identifikace						% pravd.		T index		
Kmen:																	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	Kód:						Identifikace						% pravd.		T index		

Jméno:

Kruh:

Datum:

	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 - vyloučení EPEC

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

### 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 dubiozní (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 zapište 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. ureasový test, provedený přímo s bioptickým vzorkem žaludeční sliznice. Biopťát 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.

Jméno:

Kruh:

Datum:

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 enterobakterií, 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 vibrií:	
	Nejdůležitější tekutá půda pro kultivaci vibrií:	
	Dva nejdůležitější serovary <i>V. cholerae</i>	
	Dva nejdůležitější biovary <i>V. cholerae</i> O1	

### Kontrolní otázky:

1. Víte, jaký je u enterobakterií výsledek katalasového 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. Který patogen především je diagnostikován Widalovou reakcí? O jaký typ reakce jde? Je přímá či ne?
5. Doporučují se antibiotika k léčbě gastrointestinálních infekcí? Proč?
6. Z kterého materiálu lze izolovat při tyfu *Salmonella* Typhi spíše než ze stolice?