

Téma P04: Diagnostika enterobakterií a bakteriálních původců gastrointestinálních infekcí

Ke studiu: Enterobacterales, *Vibrio*, *Aeromonas*, *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								
Triple sugar agar (Hajna) Úkol 3a									
Oxidázový test Úkol 3b									
DÍLČÍ ZÁVĚR									
XLD agar Úkol 4a									
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. **Pozor, kmen N, jehož barvení je obtížnější, nebarvíte – je již pro vás obarven.** 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 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 morfologicky jeví jako grampozitivní kok. **Misky z Úkolu 2 nepoužívejte pro jiné úkoly.**

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

a) Odečtení zkoušky na šikmém Triple Sugar Iron agaru (TSI) v modifikaci dle Hajny

Triple Sugar Iron (TSI) agar v modifikaci dle A. A. Hajny je kombinovaný zkumavkový biochemický test.

V tomto úkolu nám však půjde zejména o odlišení biochemicky neaktivních, glukosu ani laktosu nefermentujících a sirovodík netvořících tyčinek – gramnegativních nefermentujících bakterií. Na 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 skupiny *Vibrio/Aeromonas* a některé gramnegativní nefermentující tyčinky; enterobakterie (s výjimkou plesiomonád) oxidázu pozitivní 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 agarem XLD. Popište krátce kolonie enterobakterií na těchto půdách (vyplňte do tabulky). Na bočním stole ještě pro porovnání uvidíte výsledky na půdě MAL (půda velmi podobná půdě XLD, podobně jako některé další, například DC) a výsledky na půdě CIN (zde rostou yersinie v typických drobných růžových koloniích; pokud nic neroste, nejde o yersinie). Tyto výsledky se do tabulky nezaznamenávají.

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, salmonely mají bledé kolonie s černým středem na půdách XLD a MAL.

U kmene, který se jeví být salmonelou, napište jako výsledek pouze *Salmonella* sp. (popř. *Salmonella enterica*), jako procento pravděpodobnosti uveďte u tohoto kmene **součet** procent všech tří salmonel uvedených u příslušného kódu v knize, a **index typičnosti vezměte podle prvního uvedeného taxonu v kódové knize**.

Název identifikované bakterie přepište také do tabulky před úkolem č. 1.

	Zkum.	První řádek									Druhý řádek							
		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			
Kmen:																		
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
	Kód:	Identifikace									% pravd.				T index			

Úkol 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 (jako konečný závěr napište „*E. coli*, non-EPEC“)

b) Určení serovaru salmonely

U kmene určeného jako salmonela proveďte antigenní analýzu skličkovou 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 6: Testy citlivosti enterobaktérií na antibiotika

Na stole naleznete difusní diskové testy citlivosti na antibiotika u kmenů, které jste určili jako *Enterobacteriaceae*. U salmonely test záměrně chybí (nejčastěji jde o střevní nález a antibiotiky se tudíž neléčí.) Sestava antibiotik je vhodná k léčbě infekcí močových cest (IMC). Interpretujte kmeny jako citlivé (C), intermediární (I) či rezistentní (R) k daným antibiotikům. **Interpretace je v souladu s aktuálními doporučeními EUCAST#, u některých antibiotik tedy máte pouze možnost „citlivý“ či „rezistentní“, pro jiná i „intermediární“**

Kmen →									
Antibiotikum	Citlivý pokud je	Intermediární pokud	Rezistentní	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace
Ampicilin AMP	≥ 14 mm	13–15 mm	< 14 mm						
Cefazolin KZ	≥ 15 mm	13–15 mm	< 14 mm						
Ko-trimoxazol SXT	≥ 16 mm	13–15 mm	< 13 mm						
Nitrofurantoin F	≥ 11 mm	12–14 mm	< 11 mm						
Tetracyklin* TE	≥ 15 mm	12–14 mm	< 12 mm						
Cefuroxim CXM	≥ 18 mm	19–21 mm	< 18 mm						
Norfloxacin NOR	≥ 22 mm	19–21 mm	< 19 mm						

*platí také pro doxycyklin

Úkol 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:

- speciální půda s aktivním uhlím a s přípravkem antibiotik a antimykotik k odclonění jiných mikrobů,
- mikroaerofilní atmosféra,
- zvýšená teplota na 42 °C, což odpovídá tělesné teplotě ptáků coby přirozených hostitelů, a
- 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 8: Ureázový test v diagnostice helikobaktera

V diagnostice helikobakterů se využívá mj. ureázový test, provedený přímo s biotickým vzorkem žaludeční sliznice (nikoli tedy s kmenem – výjimka!). Biotát se vloží do půdy obsahující ureu a indikátor. V pozitivním případě tekutina zčervená, v negativním případě zůstane žlutá. Ze dvou vzorků (označených X a Y) vyberte, který je pozitivní.

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

Úkol 9: Diagnostika skupiny *Vibrio*–*Aeromonas*

Vibrio a *Aeromonas* jsou bakterie blízké řádu Enterobacterales, ale oxidáza-pozitivní. Pro jejich kultivace užíváme speciální půdy. Vzájemné rozlišení je možné pomocí MALDI-TOF, anebo 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:	

Důležitá poznámka: V současné klinickomikrobiologické praxi je nejběžnějším testem pro identifikaci Enterobacterales a rodů *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Vibrio* a *Aeromonas*, MALDI-TOF. Používá se tedy pro všechny bakterie z dnešního praktika. Pouze z výukových a praktických důvodů nebyl do tohoto praktika zařazen. Na druhou stranu, laboratorní pracovníci musí znát i alternativní metody identifikace, takže pro ilustraci schematu laboratorní diagnostiky bylo užitečné se s těmito metodami seznámit.