

## 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 –<br>Úkol 1                     |                  |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Kultivace<br>(KA a<br>Endova<br>půda)<br>Úkol 2 | Velikost<br>KA   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | Barva<br>KA      |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | Jiné KA          |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | Velikost<br>Endo |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | Barva<br>Endo    |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | Jiné<br>Endo     |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Hajnova půda<br>Úkol 3a                         |                  |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Oxidázový test<br>Úkol 3b                       |                  |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <b>DÍLČÍ<br/>ZÁVĚR</b>                          |                  |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Další<br>půdy<br>Úkol 4a                        | XLD<br>agar      |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | MAL<br>agar      |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   | CIN<br>agar      |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Enterotest 16<br>(Úkol 4b)                      |                  |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Antigenní analýza<br>(Úkoly 5a a 5b)            |                  |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <b>KONEČNÝ<br/>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 (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 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 |    |    |
|       | 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<br>(celý název) | Zóna Ø<br>(mm) | Interpr. | Zóna Ø<br>(mm) | Interpr. | Zóna Ø<br>(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. 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?