

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 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 sklíčkové 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 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. |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

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 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 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 čeledi *Vibrionaceae*

Vibrionaceae je bakteriální čeleď blízká *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 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?