

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									
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 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) 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:

- odlišení antigenních typů se zvýšenou virulencí – především u *E. coli* k odlišení EPEC, popř. STEC atd.
- 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 bychom provedli antigenní analýzu skličkovou aglutinací a zjistili, o který serovar se jedná. Studenti zubního směru tento test neprovádějí.

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 jiné i „intermediární“ (I).**

Kmen →									
Antibiotikum	Citlivý pokud je	Intermediární pokud	Rezistentní	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace
Ampicilin AMP	≥ 14 mm	14–17 mm	< 14 mm			Studenti Bi7170c z časových důvodů neprovádějí. Ze všech kmenů si vyberte jen jeden (libovolný). Nezapomeňte zapsat jeho písmeno!			
Cefalotin KF	≥ 18 mm	14–17 mm	< 14 mm						
Ko-trimoxazol SXT	≥ 16 mm	13–15 mm	< 13 mm						
Nitrofurantoin F	≥ 11 mm	11–14 mm	< 11 mm						
Tetracyklin* TE	≥ 15 mm	12–14 mm	< 12 mm						
Cefuroxim CXM	≥ 18 mm	14–17 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 10: Vliv různých faktorů na růst a přežití bakterií**Úkol 10a) Vliv teploty na bakterie**

Z časových důvodů pokus neprovádíme prakticky. Smyslem úkolu je pochopit rozdíl mezi inhibicí bakteriálního růstu a usmrcením bakterií, což je významné i v klinické mikrobiologii. Zapište pouze závěr, plynoucí z tabulky.

Teplota (°C)	20	30	40	50	60
První řada (kultivováno celou dobu pouze při dané teplotě)	<i>neroste</i>	<i>roste</i>	<i>roste</i>	<i>neroste</i>	<i>neroste</i>
Druhá řada (kultivováno pouze několik hodin při dané teplotě, pak přeneseno do optima)	<i>roste</i>	<i>roste</i>	<i>roste</i>	<i>roste</i>	<i>neroste</i>

Závěr. (Zapište to, co víte s jistotou. Pokud například dolní mez růstu leží mezi 20 a 30 °C, víme s jistotou, že nad 30 °C určitě roste.)

Daná bakterie roste při teplotách od ____ do ____ °C. Teplota ____ °C ji usmrcuje.

Úkol 10b) Vliv desinfekčního činidla na bakterie

Prohlédněte si výsledek pokusu na bočním stole. Bakteriální kultury byly vystaveny různým koncentracím téhož desinfekčního činidla po stejnou dobu. Poté byly přeočkovány do kultivační půdy. Ta již samozřejmě žádný desinfekční prostředek neobsahovala. Do tabulky zapište ROSTE – NEROSTE (nebo R – N)

Koncentrace	0,5 %	1 %	2 %	5 %
Výsledek				

Závěr: Minimální baktericidní koncentrace daného desinfekčního činidla je _____

Úkol 10c) Vliv času v kombinaci s teplotou

Máme zde obdobné zkumavky jako v úkolu 1a, tentokrát však byly bujony vždy vystaveny extrémním teplotám jen na nějakou dobu a poté kultivovány při teplotě pro bakterie optimální. Lišil se však čas, po jaký byly bakterie daným teplotám vystaveny. Do tabulky zapište ROSTE – NEROSTE (nebo R – N)

Teplota (°C)	160				180			
Čas (min)	10	20	30	60	10	20	30	60
Výsledek								

Závěr: Bakterie byly usmrceny při teplotě ____ za ____ minut, při teplotě ____ za ____ minut. Je vám jasné, čím je dáno, že můžeme v úkolech 1b a 1c tvrdit, že bakterie byly usmrceny a nikoli jen inhibovány?

Úkol 11 Praktický výběr vhodného desinfekčního činidla a způsobu jeho použití

Ve zdravotnictví často užíváme desinfekční prostředky a sterilizační metody. Je přitom důležité znát jejich správné použití. Zatímco **sterilizační metody** ze své definice ničí všechny mikroby a jsou tedy vhodné zejména v případě potřeby absolutní sterility (například při operacích), metody **desinfekční** jsou určeny k ničení patogenních mikrobů (čímž není dotčena jejich schopnost zničit přitom i spoustu nepatogenních organismů). Na rozdíl od sterilizace se desinfekční metody liší zejména svou účinností na různé typy organismů: vegetativní formy bakterií a kvasinek / bakteriální endospory / viry / vláknité houby / *Mycobacterium tuberculosis* / atypická mykobakteria. (Důvodem, proč jsou mykobakteria vyňata z řad ostatních bakterií je jejich extrémní odolnost vůči některým typům desinfekce.)

Kromě odolnosti vůči různým organismům ale existují i další praktická kritéria pro použití desinfekce a sterilizace. Je to zejména nutnost, aby příslušná metoda či prostředek nepoškozoval dekontaminovaný povrch či předmět (a proto se prostředek vhodný na desinfekci podlah zpravidla nehodí na desinfekci rukou) a další. Více k tomuto tématu najdete ve studijních materiálech k dnešnímu tématu.

Na bočním stole máte kartičky s příklady desinfekčních činidel a popisem jejich použití. Zkuste z nich všichni společně vytvořit dvojice. Nebude-li stačit kolektivní inteligence, pomůže vyučující. Zapište názvy metod a desinfekčních prostředků do tabulky.

Na bočním stole také máte pro informaci další materiály, týkající se desinfekce a sterilizace ve zdravotnictví (důležité části příslušné vyhlášky, ukázky desinfekčních plánů pro zdravotnická zařízení apod.)

	sterilizace kovového předmětu, který nesnese vlhké teplo
	sterilizace textilu, který nesnese teploty nad 150 °C
	tovární sterilizace jednorázových rukavic
	sterilizace plastového nástroje, který nesnese teplotu nad 100 °C
	dekontaminace fibroskopu, který nesnese sterilizaci
	ve vyšší koncentraci i proti mykobakteriím
	fyzikální desinfekce (ne sterilizace)
	samotný jako desinfekce nedostatečný

Úkol 12: Kontrola účinnosti desinfekce

Úkol 12a) Kontrola účinnosti horkovzdušného sterilizátoru pomocí bioindikátorů

V horkovzdušném sterilizátoru byly na osmi místech (v různých částech sterilizačního prostoru) umístěny bioindikátory (sporující bakterie ve formě malých peciček). Poté byly vyňaty a kultivovány ve vhodném tekutém médiu za předepsaných podmínek. Zapište, zda bioindikátor v kultivační půdě roste nebo neroste. Pozor, také tento úkol je nachystán jen v jednom exempláři na bočním stole!

Místo	A	B	C	D	E	F	G	H
Růst								

Závěr: (Nehodící se škrtněte.) Horkovzdušný sterilizátor *lze* – *nelze* používat.

Úkol 12b) Kontrola účinnosti desinfekce povrchů v nemocničním prostředí

Odečtěte výsledky bujonové kultivace stěrů z prostředí. Zapište, která místa jsou sterilní a která nikoli.

Místo (zapište)	1	2	3	4	5
Růst					