

P06

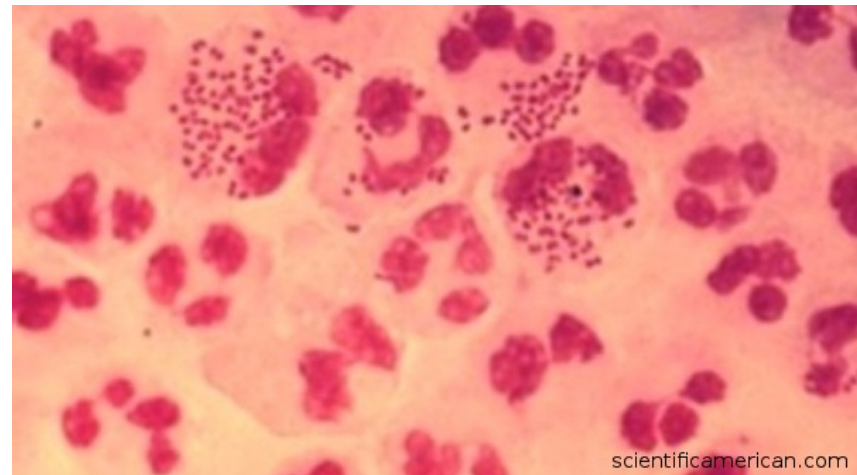
**Diagnostika některých
dalších gramnegativních
bakterií**

Osnova

- G– koky
- „jiné“ G– tyčky
- diagnostika G– koků a „jiných“ G– tyček
- úkoly

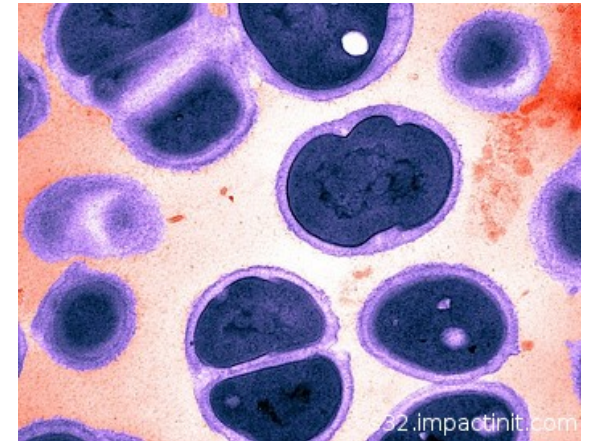
Rod *Neisseria*

- **G– koky až kokobacily, často ve dvojicích**, aerobní, mikroaerofilní (či kapnofilní)
- **KAT+, OXI+**
- **kultivačně poměrně náročné:**
 - ústní neisserie: KA
 - *N. meningitidis*: obohacený KA
 - *N. gonorrhoeae*: ČA



Neisseria gonorrhoeae

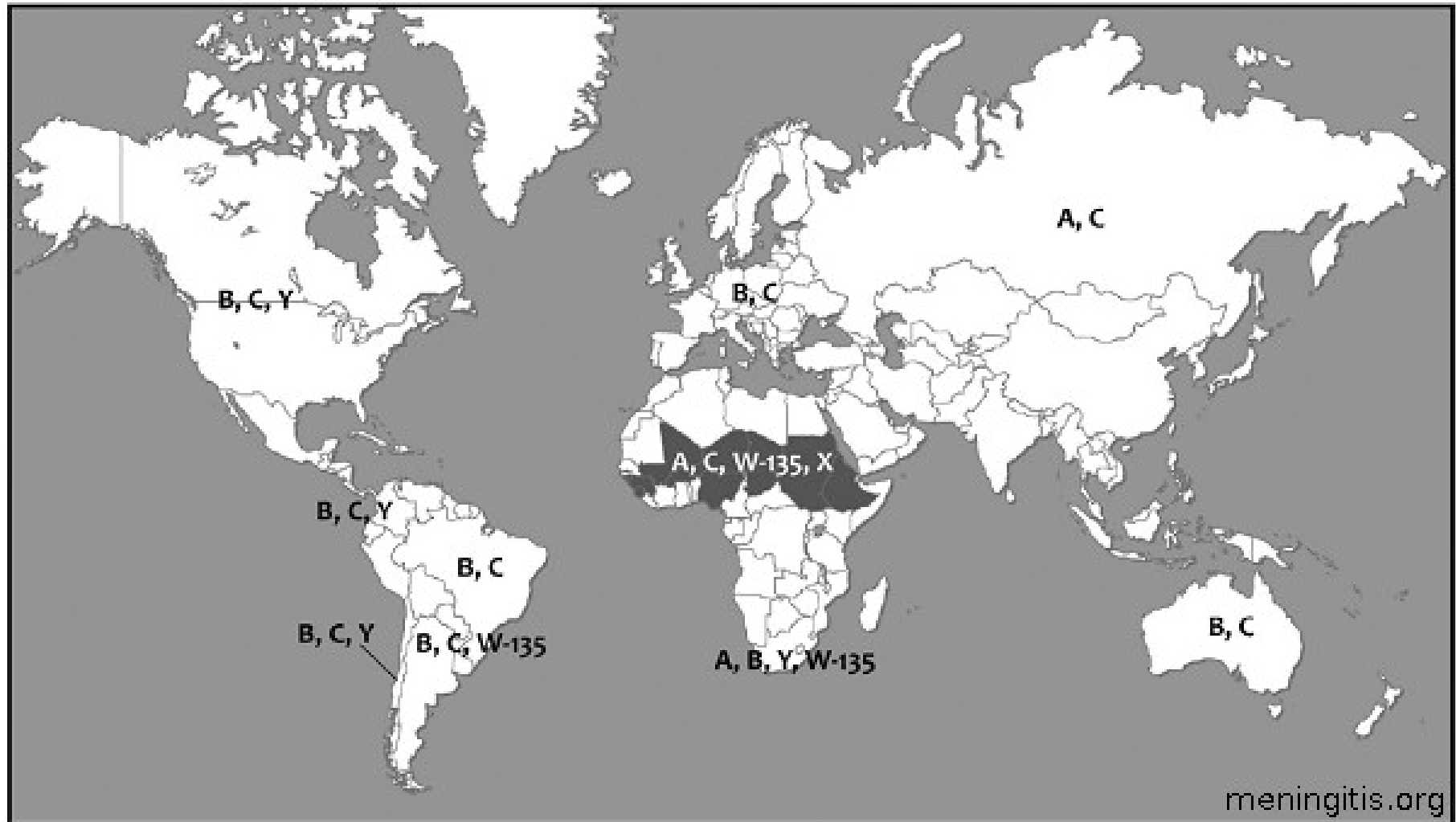
- **G– diplokok, tvar kávového zrna**, často intracelulárně (leukocyty)
- **původce kapavky**, infekce nezanechává trvalou imunitu → není možné očkování
- **citlivý na vnější vlivy** (přenáší se pouze pohlavně), nutné **omezit teplotní šok** (předehřáté medium, rychlý transport atp.)
- z důvodu citlivosti se **zasílají výtěry: ústí urethry, cervix** (nikoli pochva!), **rektum** (možný rezervoár infekce), v případě podezření výtěr z **faryngu**
- **kredeizace – prevence novorozenecké keratokonjunktivitidy** (Septonex, dříve AgNO₃)



Neisseria meningitidis

- **G– diplokok**, citlivý na teplotu
- **časté bezpříznakové nosičství**, může způsobit faryngitidy, pneumonie, až **meningitidu** a sepsi
- **meningitida málo častá, ale vysoce letální** (nutná kombinace vysoce virulentního kmenu a oslabené imunity)
- **rychlý průběh** (z plného zdraví chřipkovité příznaky, vyrážka, petechie, meningeální příznaky, sepse)
- nejčastější **seroskupiny**: A, B, C, W135, a Y
 - možné **očkování** (v **ČR** nejčastější **seroskupiny B a C**, jinde častější ostatní typy, viz mapa)
 - očkování proti seroskupině B pokrývá $\frac{3}{4}$ kmenů

Neisseria meningitidis (2)



- „meningitis belt“ v Africe

„Ústní“ neisserie

- **běžná mikroflóra dutiny ústní a faryngu**
- **obyčejně nepatogenní**, při poruše imunity endokarditidy, meningitidy
- **koky, kokobacily** (nemusí se jednat o diplokoky)
- kultivace málo náročná, postačí KA

Srovnání neisserií

	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
gonokok	nejchoulostivější, přenos jen sexuální	nejchoulostivější, roste jen na čokoládovém agaru
meningokok	méně choulostivý, přenos na krátké vzdálenosti i kapénkami	méně choulostivý, je-li krevní agar obohacen, může na něm růst
„ústní“ neisserie	nejméně choulostivé	roste i na chudém krevním agaru

Rod *Moraxella*

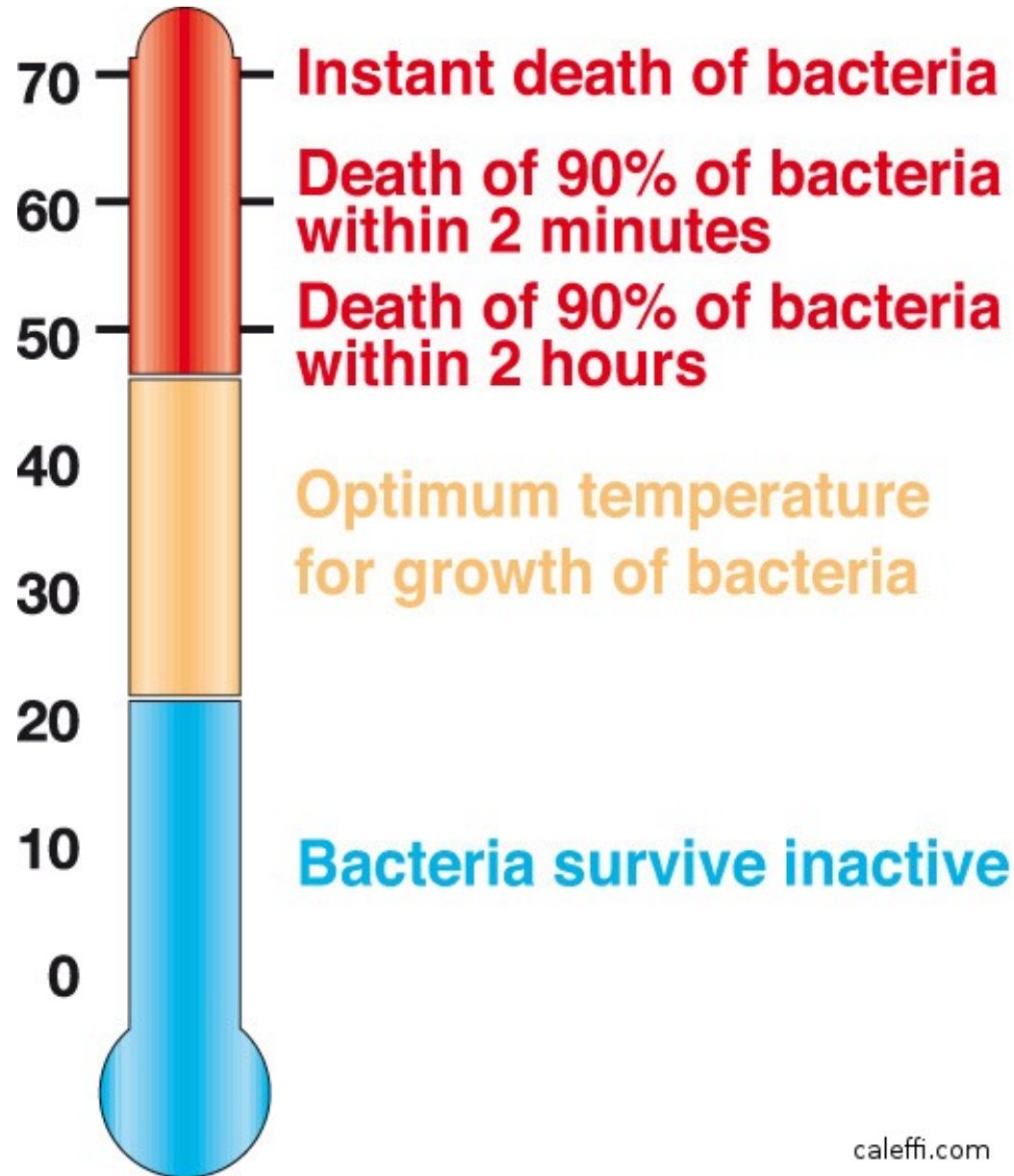
- krátké tyčky, kokobacily, ***M. catarrhalis* diplokok**
- **KAT+, OXI+, INAC+** (indoxylacetátový test)
- sliznice nasofaryngu, spojivkového vaku, genitální trakt
- ***Moraxella catarrhalis*** (dříve rod *Branhamella*):
 - záněty HCD u dětí (sinusitis, otitis media)
- ***Moraxella lacunata***
 - konjunktivitida

Legionella pneumophila

- **kultivačně náročná G– tyčka**, více sérotypů, speciální půda BCYE
- nejčastější **původce legionářské nemoci (pneumonie)**
- **pontiacká horečka** (lehké chřipkové onemocnění s bolestmi hlavy a svalů, **bez postižení plic**)
- **rezervoár ve vodovodech**, klimatizaci, atp. → nutné pečlivé plánování vodovodní sítě
- **přenos inhalací kontaminovaného aerosolu**

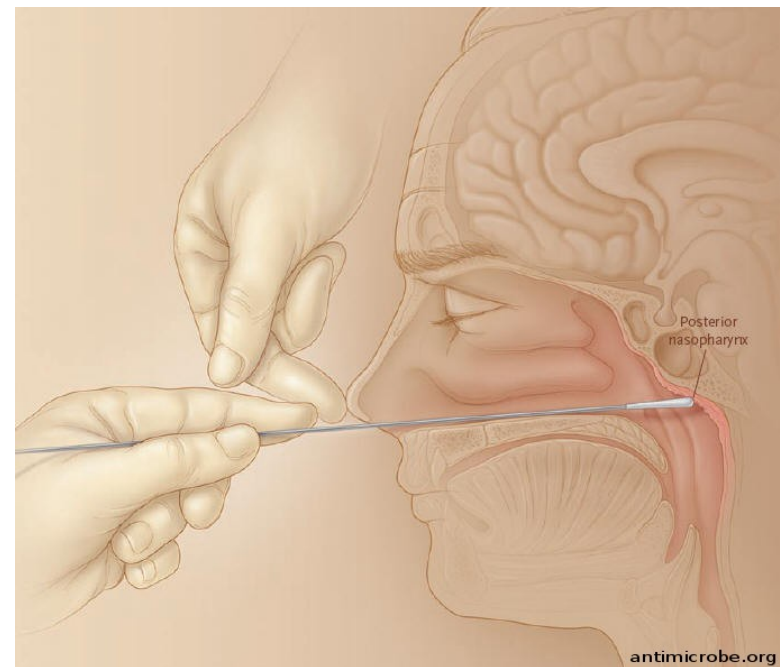


Legionella pneumophila (2)



Rod *Bordetella*

- **G– kokobacily, Bordetova-Gengouova půda**
- **řasinkový epitel HCD, přenos kapénkově**
- ***B. pertussis* a *B. parapertussis***, původci **pertusse** (dávivý neboli **černý kašel**), resp. **parapertusse**
- ***B. bronchiseptica*** (primárně zvířecí patogen, vyvolává respirační onemocnění psů, prasat, atd., ojedinělý přenos na člověka, obtíže podobné pertussi)
- pro diagnostiku se používá **pernasální výtěr**



Rod *Brucella*

- **G– kokobacily**
- **pro člověka patogenní *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* a *B. canis***
- **Bangova choroba** (neboli **brucelóza**, undulující horečka či maltská horečka)
 - místem vstupu nejčastěji poraněná kůže nebo sliznice
 - **intracelulární parazit fagocytujících buněk**, v makrofázích jsou roznášeny po celém těle → **široká škála příznaků** (horečka, zimnice, pocení, únava, myalgie, svalová slabost, nechutenství...)
 - **diagnostika zejména hemokultivace a serologie na specializovaném pracovišti**

Francisella tularensis

- **G– kokobacily, intracelulární parazit**
- **původce tularémie**
 - **primárním rezervoárem hlodavci a klíšťata**
 - **charakteristické fokálním vředem v místě vniknutí do organismu a zvětšením místních mízních uzlin**
 - **podle brány vstupu různá klinická manifestace** (od nejčastější formy ulceroglandulární až po septickou)



Diagnostika G- koků

- u podezření na kapavku **důležité provést správně odběry** (vysoce citlivé mikroorganismy)
 - časté, že patogen nepřežije transport
 - **doporučováno poslat také nátěr na sklíčko z cervixu a urethry** (ne z rekta a faryngu)
- **purulentní meningitida**
 - odebírá se mozkomíšní mok, případně krev na hemokultivaci
 - mozkomíšní mok lze vyšetřit biochemicky, cytologicky a **mikrobiologicky (mikroskopie, přímý průkaz antigenu)**
 - nejdůležitější co nejrychlejší zahájení léčby pacienta!

Kultivace G- koků

- **drobné, bezbarvé nebo nažloutlé kolonie**, rostoucí (podle druhu) na krevním či čokoládovém agaru
- **KA či ČA nezbytný i pro difusní diskový test**

	KA	KA+	ČA
gonokoky	NE	NE	ANO
meningokoky	NE	ANO	ANO
ústní neisserie a moraxelly	ANO	ANO	ANO

Diagnostika „jiných G- tyček“

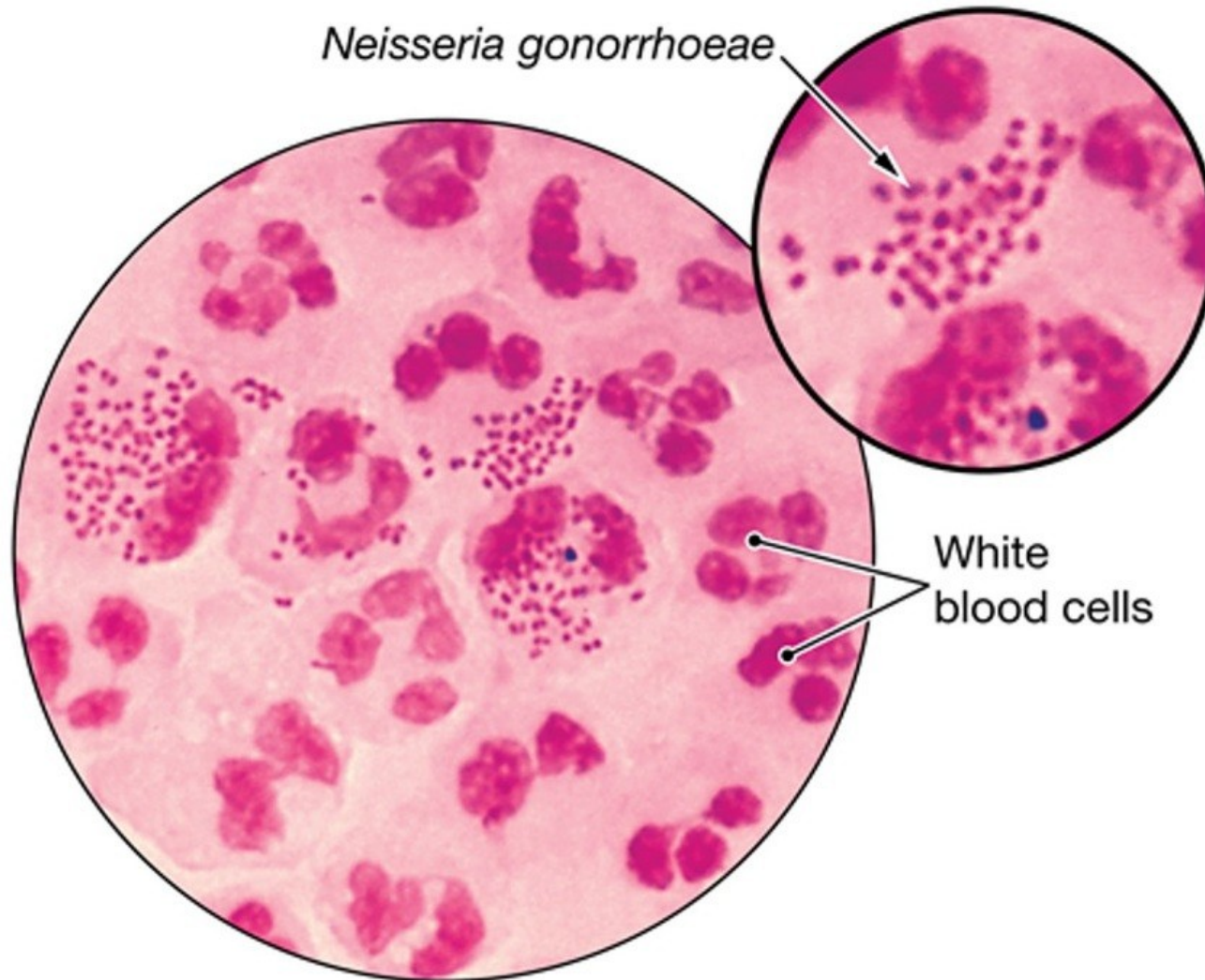
- **mikroskopie: G – kokotyčky**
- **kultivace:** zpravidla **speciální půdy** (BG pro bordetely, BCYE pro legionely atd.)
- biochemická identifikace: některé znaky mohou být využity
- antigenní analýza: někdy se využívá
- **nepřímé metody:** využívají se, např. aglutinace u tularémie
- **diferenciální diagnostika neprobíhá algoritmicky** (vzorky zasílány na vyšetření přímo s podezřením na legionelózu, dávivý kašel, Bangovu chorobu apod.)

Úkol 1: Mikroskopie klinického vzorku a mikroskopie kmene

- **úkol 1a: Pozorování uretrálního nátěru u kapavky**
 - zakreslete koky, leukocyty a jejich uložení
- **úkol 1b: Mikroskopie suspektních kmenů**
 - 4 kmeny G– koky, jeden kmen G+ kok

Intracelulární uložení gonokoků

Microscopic View of Urethral Sample



Úkol 2: Kultivace na agarových půdách

- popište kolonie všech kmenů na KA+, jeden kmen, který tam neroste, popište na ČA

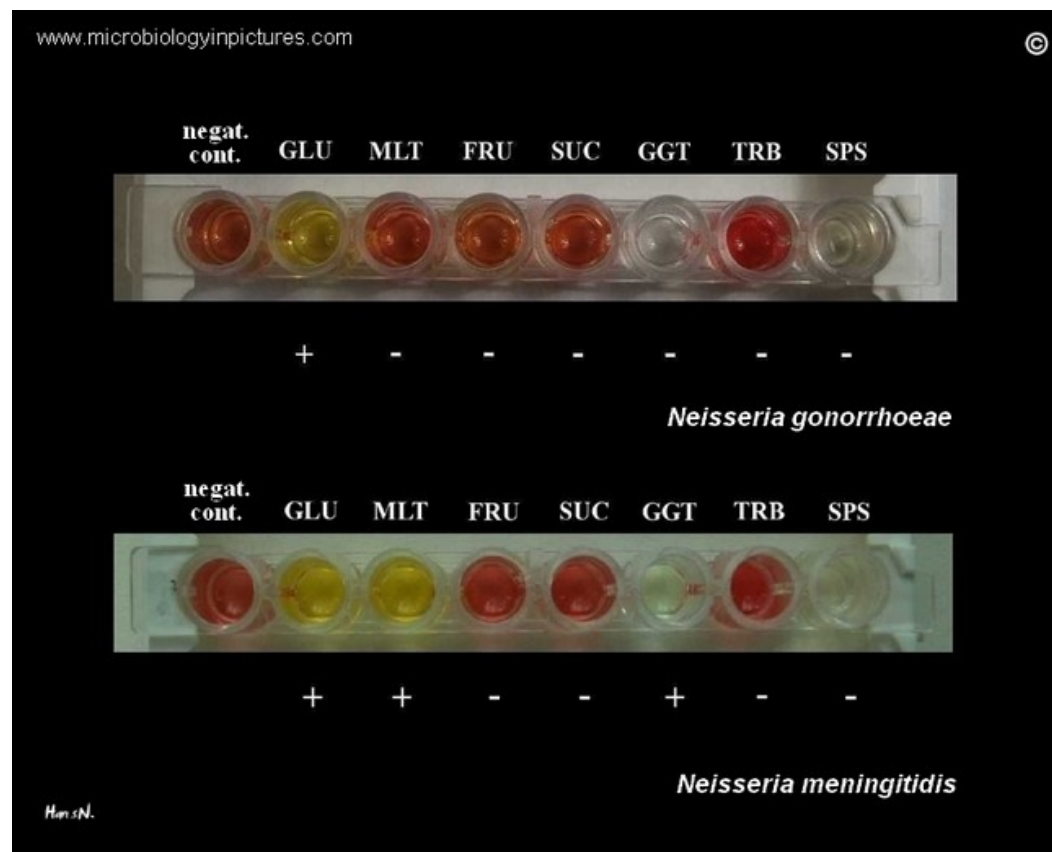
	KA	KA+	ČA
gonokoky	NE	NE	ANO
meningokoky	NE	ANO	ANO
ústní neisserie a moraxelly	ANO	ANO	ANO

Úkol 3: Základní biochemické testy u G- koků

- testy budou prováděny demonstračně na bočním stole
- **úkol 3a: Oxidázový test k odlišení neisserií a moraxel od případných jiných G- koků**
- **úkol 3b: Indoxylacetátový test k odlišení *Moraxella catarrhalis* od neisserií**
 - proužkový test, pozitivní je modrozelené zbarvení po několika minutách

Úkol 4: Diagnostika neisserií a moraxel biochemickými testy

- v našich podmínkách **NEISSERIAtest**
- **povšimněte si slabé biochemické aktivity patogenních neisserií**
- **gonokok štěpí jen glukózu**
- **meningokok jen glukózu a maltózu**



Úkol 5: Test citlivosti G- koků na antibiotika

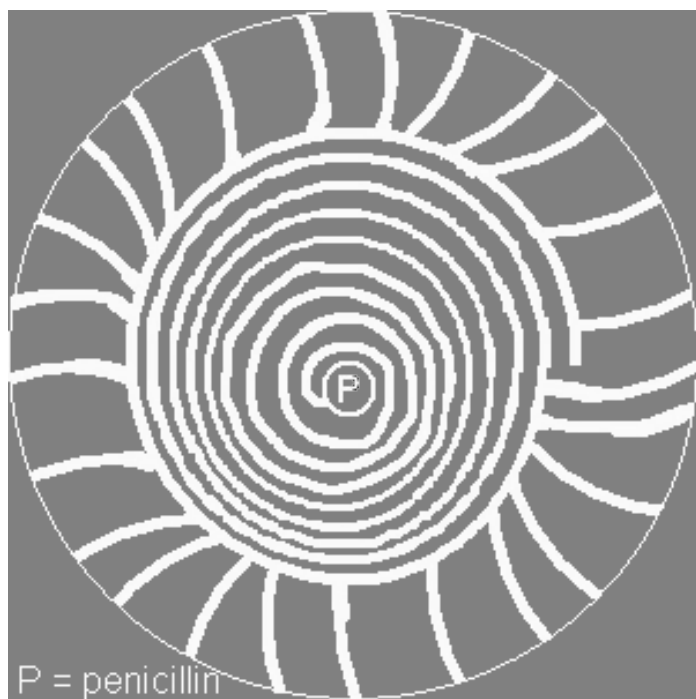
- vyhodnoťte diskové difúzní testy meningokoků a gonokoků
- *Moraxella catarrhalis* vzhledem k hraniční patogenitě odečítat nebudete

Úkol 6: Přímý průkaz antigenů původců meningitid

- **prohlédněte si soupravu** a zapište názvy mikrobů, které mohou být touto metodou diagnostikovány:
 - *Neisseria meningitidis* A (teenageři, batolata)
 - *Neisseria meningitidis* B (teenageři, batolata)
 - *Neisseria meningitidis* C (teenageři, batolata)
 - *N. meningitidis* Y/W135 (teenageři, batolata)
 - *Haemophilus influenzae* b (dříve batolata)
 - *Streptococcus pneumoniae* (senioři)
 - *Streptococcus agalactiae* (novorozenci)
 - (nejtypičtější věková skupina uvedena v závorce)
- **prohlédněte si videoklip** a zapište určený patogen

Úkol 7: Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel

- **úkol 7a: Kultivační diagnostika bordetel**
 - výtěr je smíchán s kapkou
 - očkován ve směru spirály
 - poté jsou očkovány radiální paprsky kličkou



Úkol 7: Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel

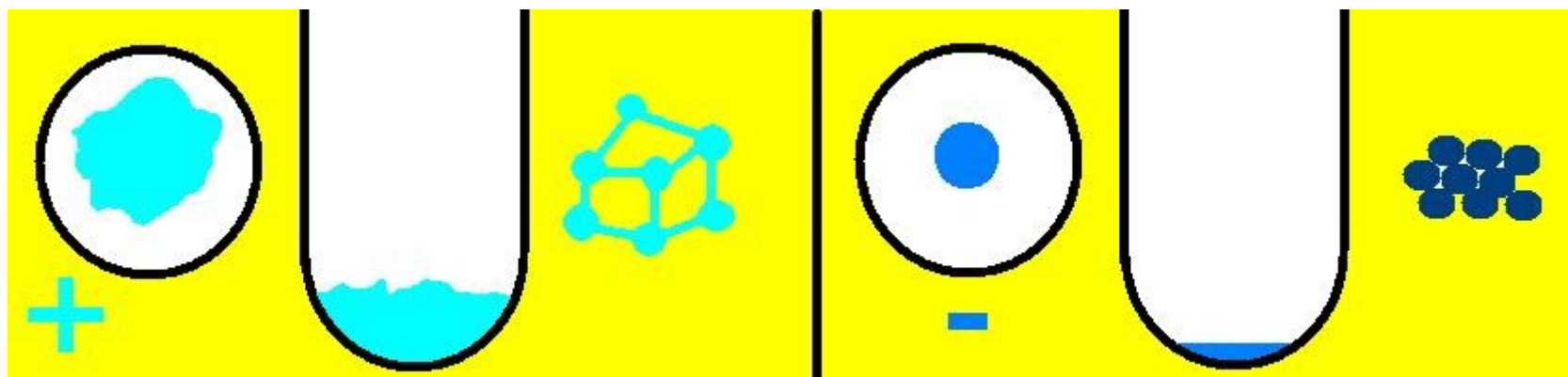
- **úkol 7b: Demontrace kultivační půdy na legionely (Buffered Charcoal Yeast Extract)**



některé legionely
fluoreskují v UV světle

Úkol 7: Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel

- **úkol 7c: Průkaz protilátek proti tularémii**
 - **aglutinace je mapovitý povláček** na dně důlku (buňky jsou provázány protilátkami)
 - **negativní reakce je kompaktní pravidelná tečka** (sedimentované bakteriální buňky)



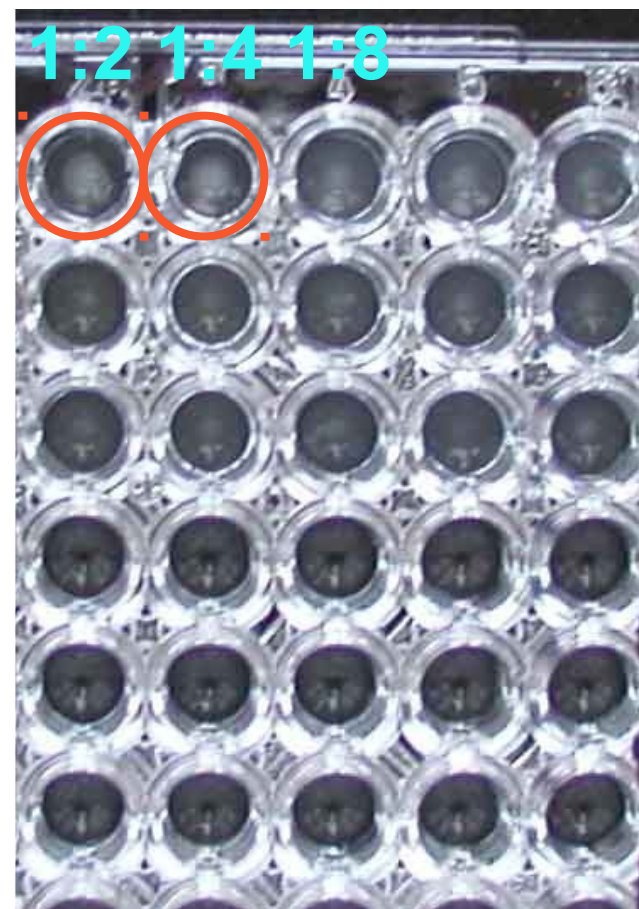
pozitivní

negativní

Úkol 7: Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel

- **úkol 7c: Průkaz protilátek proti tularémii**

- **1. řada:**
aglutinát je viditelný
v ředění 1:2 a 1:4,
nikoli však již 1:8 a vyšším
titr je 1:4
- **2. řada:**
v žádném důlku
není aglutinace →
žádný titr,
negativní reakce



Úkol 7: Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel

- **úkol 7d: Diagnostika protilátek proti brucelóze**
 - provedena **ELISA** ve třídách IgG i IgM
 - **pokuste se o závěrečnou interpretaci**
 - **pozitivní IgM → akutní infekce**
 - **pozitivní igG → prodělaná/chronická infekce**

Po tomto cvičení byste měli umět:

- popsat nejdůležitější zástupce rodů *Neisseria* a *Moraxella*, vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- zhodnotit nároky na transport a výživu rodů *Neisseria* a *Moraxella*
- jmenovat původce purulentních meningitid, vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- popsat „jiné“ G– tyčky, jejich nároky na kultivaci a možné diagnostické metody