

G- koky praktikum č. 6

Lékařská mikrobiologie – cvičení
Mikrobiologický ústav LF MU

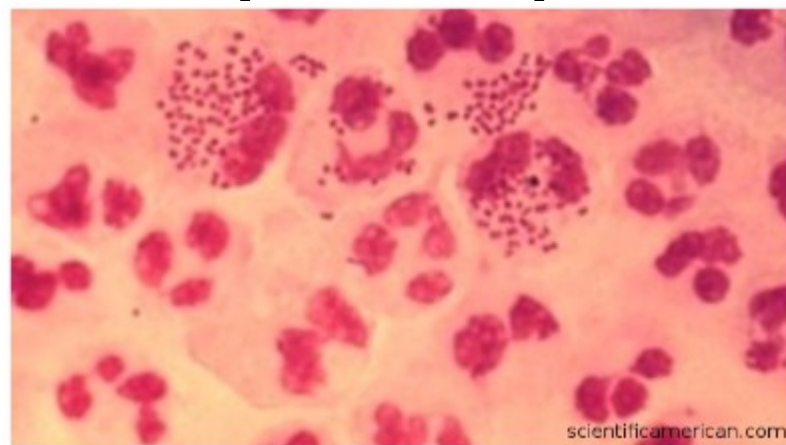
Obsah cvičení

- ▶ G- koky a ostatní G- tyčinky
 - Charakteristika, význam, léčba
 - Diagnostika



G- koky – rod *Neisseria* (1)

- ▶ Kultivačně náročné G- koky až kokotyčky:
 - Ústní neisserie: běžný krevní agar
 - Meningokok: obohacený krevní agar
 - Gonokok: čokoládový agar
- ▶ Často se vyskytují jako diplokoky.
- ▶ Kataláza i oxidáza pozitivní.
- ▶ Aerobní / mikroaerofilní. Některé druhy mohou vyžadovat zvýšenou tenzi CO₂.



G- koky – rod *Neisseria* (2)

▶ *Neisseria gonorrhoeae* (gonokok):

- Původce **kapavky** – klinické projevy: zánět uretry a u žen také zánět cervixu, výskyt také ve faryngu a rektu. U žen se nejedná o zánět pochvy → **na test na kapavku se neprovádí výtěr z pochvy!**
- Onemocnění nezanechává trvalou imunitu → není možné očkování.
- Kredeizace = prevence novorozenecké keratokonjunktivitidy (Septonex, dříve AgNO_3).



G- koky – rod *Neisseria* (3)

▶ *Neisseria meningitidis* (meningokok):

- Způsobuje meningitidy, ale také sepse – vždy se jedná o klonální kmeny. Míra virulence souvisí s proteinovými antigeny. Polysacharidové antigeny určují především to, zdali lze infekci kmenem předejít očkováním.
- Meningitidy málo časté, ale vysoce letální s velmi rychlým průběhem z plného zdraví chřipkovité příznaky, vyrážka, petechie, meningeální příznaky, sepse)
- Přenos: těsný kontakt. Vzniku infekce napomáhá narušená sliznice, oslabený organismus.
- U nás vzácný výskyt ve srovnání s hlavně středoafričskými zeměmi.



G- koky – rod *Neisseria* (4)

▶ Léčba meningitidy:

- Zajištění základních životních funkcí – hlídání krvácení a acidobazické rovnováhy.
- Okamžité podání ATB – lék volby = klasický penicilin.
- Další ATB: cefalosporiny 3.generace (ceftriaxon – dobrý průnik do likvoru).

▶ Očkování:

- Nízká incidence v Evropě – neočkuje se celá populace, ale pouze rizikové skupiny.
- Problém: seroskupina B → slabá Ag determinanta. Dnes existuje univerzální vakcína, ale s nejistou účinností.
- **Vakcíny:** staré polysacharidové chrání hůře než nové konjugované. Rozdíly také v seroskupinách (samotně C, A + C nebo tetra vakcína A + C + W135 + Y). V Česku nejběžněji B a C.



Různé serotypy rodu *Neisseria*

<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/09vol35/acs-dcc-4/index-eng.php>



G- koky – rod *Neisseria* (5)

▶ Ústní neisserie:

- Běžná mikroflóra dutiny ústní a faryngu.
- Obyčejně nepatogenní, při poruše imunity endokarditidy, meningitidy.
- Koky, kokobacily, méně často ve formě diplokoků.
- Růst možný na neobohaceném krevním agaru.



Srovnání zástupců rodu *Neisseria*

	In vivo	In vitro
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
Tzv. „ústní“ neisserie	Nejméně choulostivé	Roste i na chudém krevním agaru



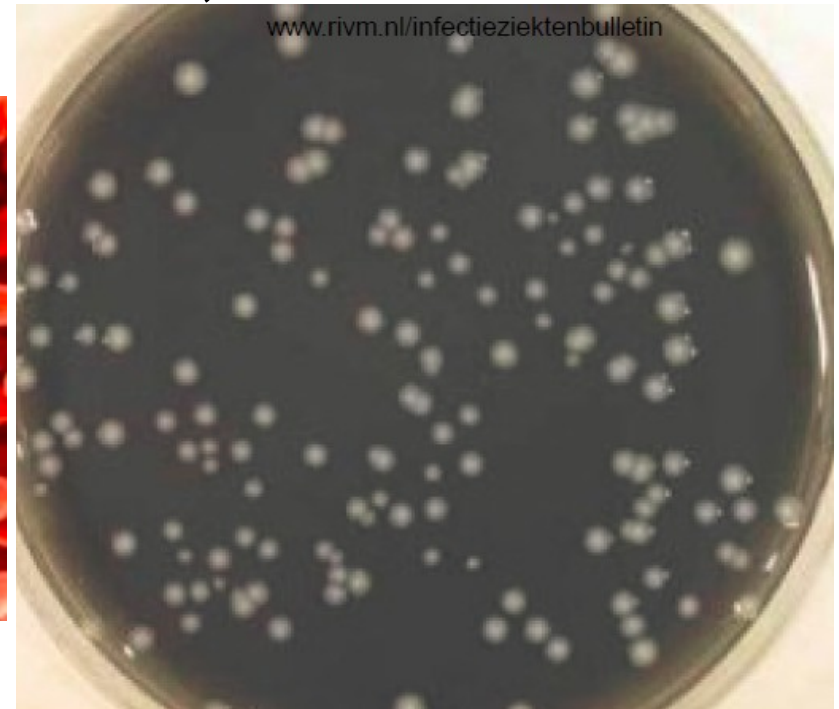
G- koky – rod *Moraxella*

- ▶ ***Moraxella* (podrod *Branhamella*) *catarrhalis*:**
 - Přítomna i u zdravých osob ve faryngu.
 - Jako čistá kultura způsobuje **sinusitidy, otitis media, faryngitidy** a podobně.
 - *Moraxella catarrhalis*
 - Kataláza, oxidáza
- INAC pozitivní



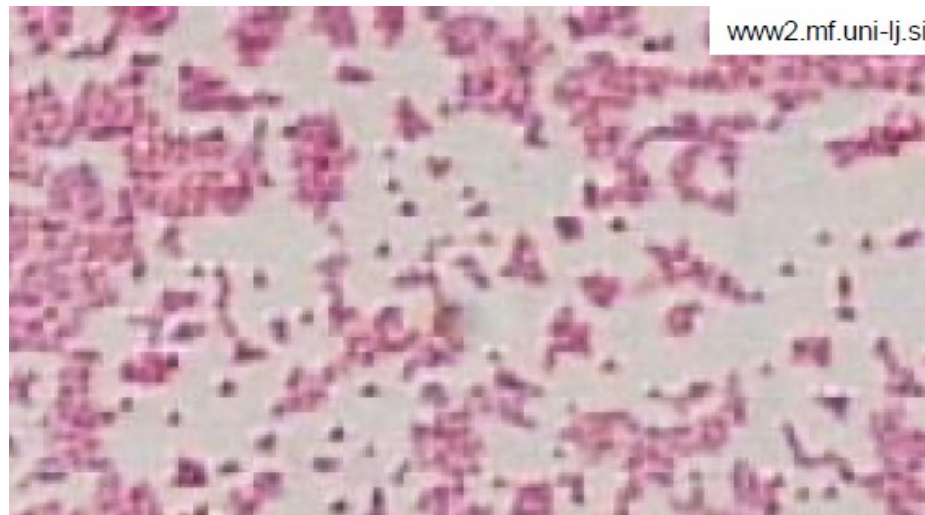
Další G- tyčinky – *Legionella pneumophila*

- ▶ *Legionella pneumophila* způsobuje legionářskou nemoc (těžší varianta) nebo Pontiacskou horečku (lehčí varianta nepostihující plíce).
- ▶ **Rezervoár:** vodovody, klimatizace, atd.



Další G- tyčinky – rod *Bordetella*

- ▶ ***B. pertussis* a *B. parapertussis***: původci černého kašle – velice vzácný díky očkování. Jako odběrový materiál se používá perinasální výtěr (=odběr z nosohltanu bez dotyku okolních sliznic).
- ▶ ***B. bronchiseptica***: původce různých patologických stavů člověka a zvířat.



Další G- tyčinky – rod *Brucella*

- ▶ Klasický původce zoonóz.
- ▶ ***Brucella abortus***: kraví patogen. Napadá hovězí placenty, způsobujíc zmetání (potraty) skotu. U lidí způsobuje **Bangovu nemoc** (vstupem je poraněná kůže, horečka, orgánová postižení atd.)
- ▶ ***Brucella suis***: prasata
- ▶ ***Brucella melitensis***: ovce
- ▶ ***Brucella canis***: psi



<http://upload.wikimedia.org>



Další G- tyčinky – rod *Francisella*

- ▶ Nejdůležitějším druhem je *Francisella tularensis*:
 - Tularémie = zaječí mor. Ohrožené skupiny: myslivci, kuchaři pracující se zvěřinou.
 - Napadá rány, ale je možné ji tak vdechnout → zápaly plic.



Diagnostika G- koků (1)

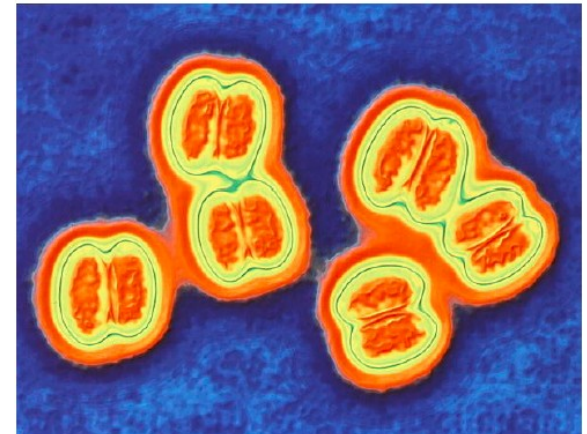
- ▶ ***Neisseria gonorrhoeae***: zásadní je správný odběr. Velice citlivý patogen, který často nepřežije prevoz → doporučování je poslat také nátěr na sklíčko z cervixu a urethry (avšak ne z rekta a faryngu)
- ▶ Komplexní vyšetření na kapavku tedy zahrnuje:
 - **výtěr z urethry** na Amiesovu půdu + **nátěr**
 - **výtěr z cervixu** (ženy) na Amiesovu půdu + **nátěr**
 - **výtěr z rekta** na Amiesovu půdu (bez nátěru)
 - **výtěr z faryngu** na Amiesovu půdu (bez nátěru)



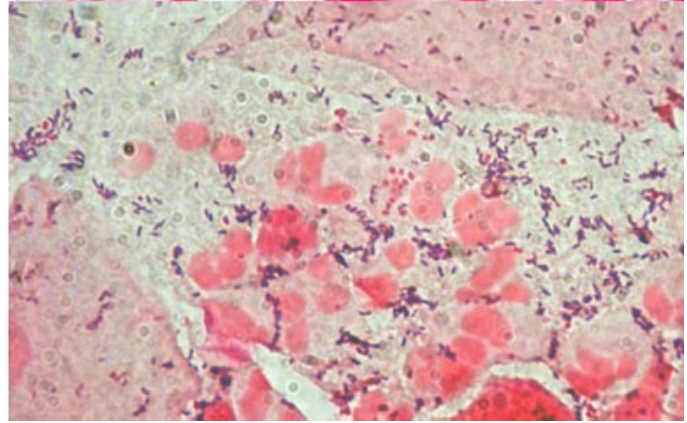
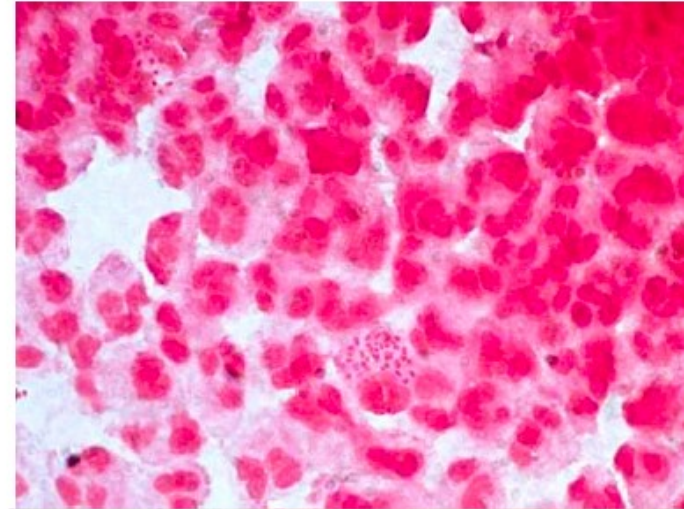
Diagnostika G- koků (2)

- ▶ ***Neisseria meningitidis* – purulentní meningitida:**
 - Odběr mozkomíšního moku – vyšetření biochemicky, cytologicky, mikrobiologicky.
 - Při odběru: likvor je zkalený, vytéká pod tlakem.
 - V laboratoři: mikroskopie (G- diplokoky tvaru kávového zrna, často intrecelulárně lokalizované), přímý průkaz antigenu
 - Nejdůležitější je okamžité zahájení léčby!

<http://medicine.plosjournals.org>



Nátěry kapavky



Diagnostika G- koků (3)

Neisserie a moraxelly:

- ▶ **Kultivace:** drobné, bezbarvé nebo nažloutlé (podle druhu) kolonie, rostoucí (podle druhu) na krevním či čokoládovém agaru.
 - **Gonokoky:** rostou jen na čokoládovém agaru
 - **Meningokoky:** rostou na bohatších krevních, ale samozřejmě i na čokoládových agarech
 - **Ústní neisserie a *M.catarrhalis*** rostou na chudém i bohatém krevním agaru i na čokoládovém agaru
- ▶ Krevní agar či čokoládový agar je nezbytný i pro **difusní diskový test.**



Diagnostika G- koků (4)

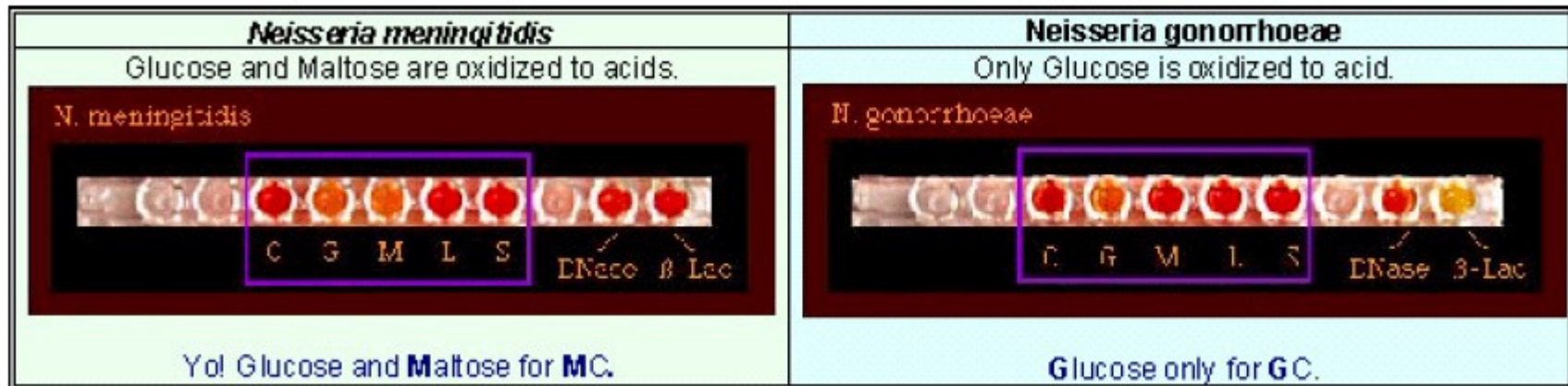
Neisserie a moraxelly:

- ▶ **Biochemie:** kataláza pozitivní, oxidáza pozitivní (*Moraxella* může mít opožděnou reakci); *Moraxella catarrhalis* pozitivní ve specifickém testu, zvaném INAC (indoxylacetátový test).
- ▶ Pozn. U INAC testu se postupuje jako u oxidázy, ale proužek je nutno zvlhčit a je nutno pět minut počkat. Zbarvení je modrozelené.
- ▶ **Antigenní analýza:** zpravidla prováděná jako latexová aglutinace, velmi důležitá u meningokoků k určení seroskupiny.



Druhové určení neisserií

- ▶ Biochemické testy: zpravidla NEISSERIAtest, v jiných zemích jiné testy.
- ▶ Poměrně malá biochemická aktivita: gonokok štěpí jen glukózu, meningokok jen glukózu a maltózu.



Diferenciální diagnostika: neisserie a moraxelly (1)

- ▶ **Gramovo barvení:** G- (diplo)koky
- ▶ **Oxidáza** (pozitivní) rozlišuje některé jiné G- koky (např. acinetobaktery ze skupiny G- nefermentujících bakterií jsou také kokoidní)
- ▶ **Růst na různých půdách** rozliší
 - **gonokoky** (rostou jen na čokoládovém agaru),
 - **meningokoky** (rostou na bohatších krevních, ale samozřejmě i na čokoládových agarech)
 - **ústní neisserie** (rostou na chudém i bohatém krevním agaru i na čokoládovém agaru)
 - ***M. catarrhalis*** (růst jako u ústních neisserií)



Diferenciální diagnostika: neisserie a moraxelly (2)

- ▶ **INAC test** (proužkový test podobný oxidázovému) – pozitivní u *Moraxella catarrhalis*.
- ▶ **Komplexní biochemický test** (NEISSERIA test) se používá hlavně k vzájemnému rozlišení ústních neisserií.
- ▶ **Antigenní analýza** (určení seroskupiny meningokoků u invazivních infekcí).



Diagnostika jiných G- tyčinek

- ▶ **Mikroskopie:** G- tyčinky, často krátké
- ▶ **Kultivace:** zpravidla speciální půdy (BG = Bordet Gengouva pro bordetely, BCYE pro legionely atd.)
- ▶ **Biochemická identifikace:** některé znaky mohou být využity
- ▶ **Antigenní analýza:** někdy užitečná
- ▶ **Nepřímé metody** se využívají, nejčastěji u tularémie
- ▶ **Diferenciální diagnostika** tu neprobíhá algoritmicky.
- ▶ Zpravidla jsou vzorky zasílány na vyšetření přímo s podezřením na legionelózu, dávivý kašel, Bangovu chorobu apod.



Speciální očkování bordetel

Tento zvláštní způsob se používá proto, že zkušenost ukázala, že zvyšuje záchyt bordetel.

- 1) Naočkování středového pole do kapky penicilinu
- 2) Spirála směrem k.okraji
- 3) Radiální paprsky



BCYE pŭda pro legionely

Buffered
Charcoal
Yeast
Extract



<http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr>



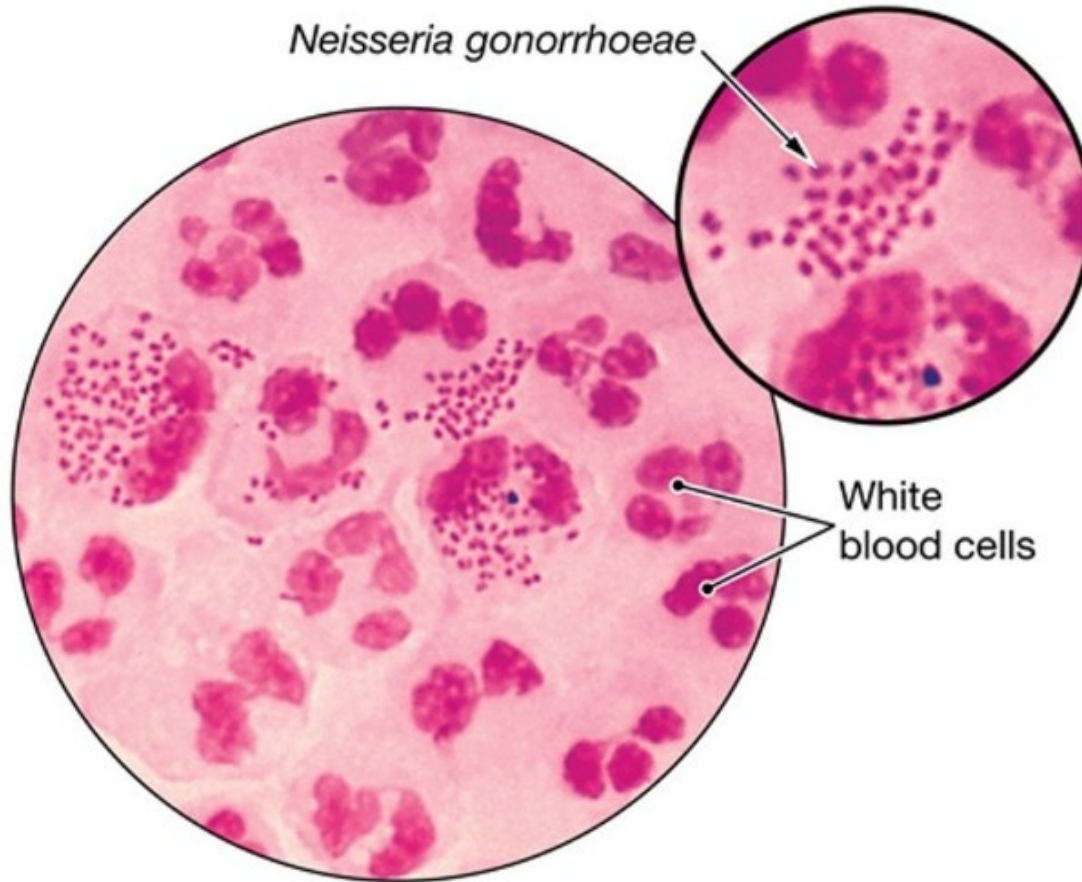
Úkol č. 1 – Mikroskopie

- ▶ **1a)** Mikroskopujte uretrální nátěr kapavky, vše zakreslete (diplokoky, leukocyty).
- ▶ **1b)** 4 kmeny G- koky, jeden G+.
 - ▶ Obarvěte podle Grama 12 podezřelých kmenů (pro zopakování: natřít → nechat uschnout → fixovat plamenem → poté barvit: Gram 30 s → Lugol 20-30 s → **opláchnout vodou** → alkohol 15-20 s → opláchnout vodou → safranin 60 → opláchnout vodou → **osušit filtračním papírem (nedrhnout buničinou ani ničím jiným!)** → imerzní objektiv - olej)



Intracelulární uložení gonokoků

Microscopic View of Urethral Sample



Úkol č. 2 – Kultivace na agarových půdách

- ▶ Popište nárůst kolonií na KA, ty které zde nerostou popište na čoko agaru (jeden kmen).
- ▶ Neobohacený KA: ústní neisserie, moraxelly
- ▶ Obohacený KA: ústní neisserie, moraxelly, meningokok
- ▶ Čoko agar: ústní neisserie, moraxelly, meningokok, gonokok



Úkol č. 3 – Základní biochemické testy

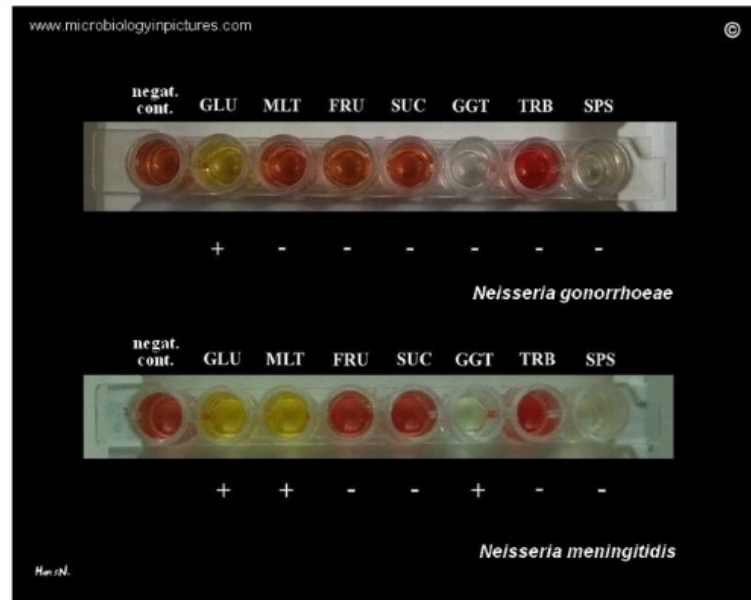
- ▶ Pouze demonstračně na bočním stole!!!
- ▶ **3a)** Oxidázový test k odlišení neisserií a moraxel od případných jiných G- koků.
- ▶ **3b)** Indoxylacetátový test k odlišení *Moraxella catarrhalis* od neisserií.



Úkol č. 4 – Určení G– glukózu nefermentujících bakterií a G– koků (2)

NEISSERIAtest:

- ▶ Jeden řádek – 1. jamka = negativní kontrola. **Test začíná od 2. jamky!!!**
- ▶ Nutno zakápnout Lugolovým roztokem před provedením odečtu (nemusíte dělat).
 - **Gonokok štěpí glukózu**
 - **Meningokok štěpí maltózu a glukózu**



Úkol č. 5 – Testy citlivosti patogenů na antibiotika

- ▶ Odečtěte difúzní diskové testy pro gonokoka a meningokoka.
- ▶ Test pro *Moraxellu* se vzhledem k hraničním citlivostem neprovádí.



Úkol č. 6 – Přímý průkaz Ag původců meningitid v mozkomíšním moku

▶ 6a) Demonstrace soupravy k latexové aglutinaci

- *Neisseria meningitidis* A
 - *Neisseria meningitidis* B
 - *Neisseria meningitidis* C
 - *N. meningitidis* Y/W135
- } **teenageři, batolata**
- *Haemophilus influenzae* b **batolata (dříve)**
 - *Streptococcus pneumoniae* **senioři**
 - *Streptococcus agalactiae* **novorozenci**

▶ 6b) Videoklip



Úkol č. 7 – Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel (1)

- ▶ **7a: Kultivační diagnostika bordetel: BG = Bordet Gengouva**
- ▶ **7b: Demonstrace kultivační půdy na legionely: BCYE**

Buffered
Charcoal
Yeast
Extract

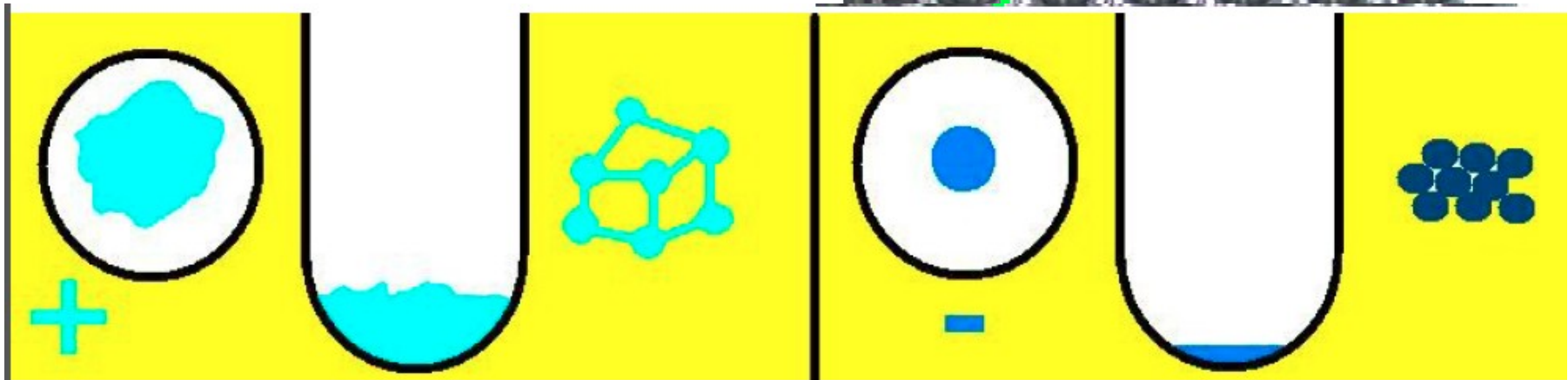
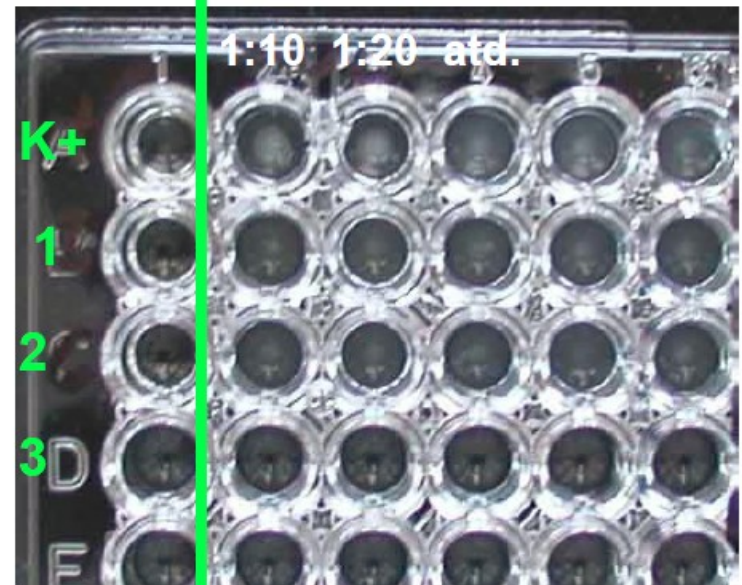


<http://medecinepharmacie.univ-foix.fr>



Úkol č. 7 – Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel (2)

- ▶ 7c: Průkaz protilátek proti tularémii: odečte se titr s nejvyšší pozitivní reakcí. Zde jakýkoliv titr = pozitivní reakce!



Úkol č. 7 – Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel (3)

- ▶ **7d: Diagnostika protilátek proti brucelóze:**
 - **Akutní infekce:** velké množství protilátek, převážně třídy IgM, případně IgM i IgG.
 - Pacient po prodělané infekci: malé množství protilátek, pouze IgG (imunologická paměť).
 - **Chronická infekce:** různé možnosti podle aktivity infekce, mikrobiálního druhu apod.



Po tomto cvičení byste měli znát:

- ▶ G- koky: **neisserie**, moraxelly, brucelly, legionelly, franciselly – nejvýznamnější zástupci, jejich diagnostika a léčba. Rozdíly v použitých kultivačních půdách!

