P06

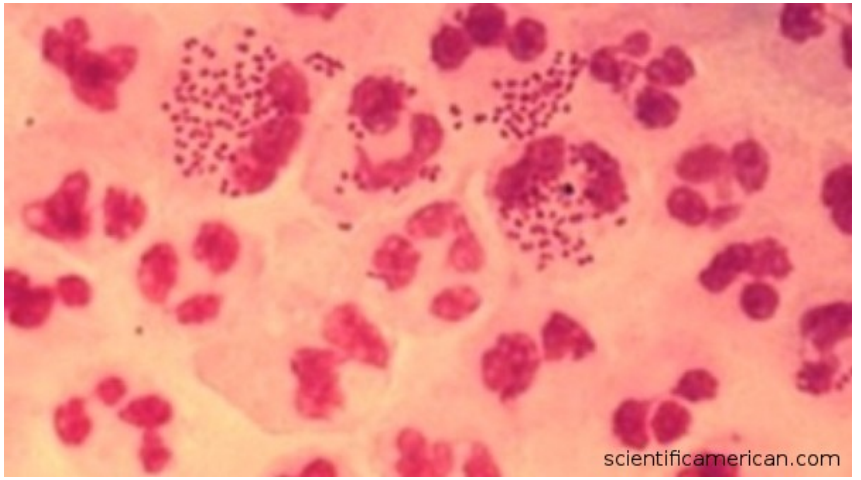
Diagnostika některých dalších gramnegativních bakterií

Osnova

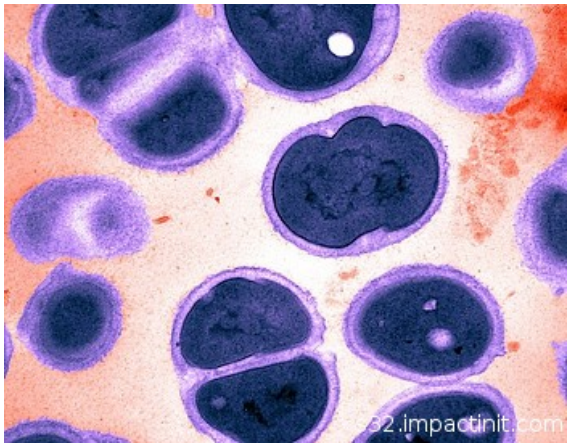
- G– koky
- „jiné“ G– tyčky
- diagnostika G– koků a „jiných“ G– tyček
- úkoly

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

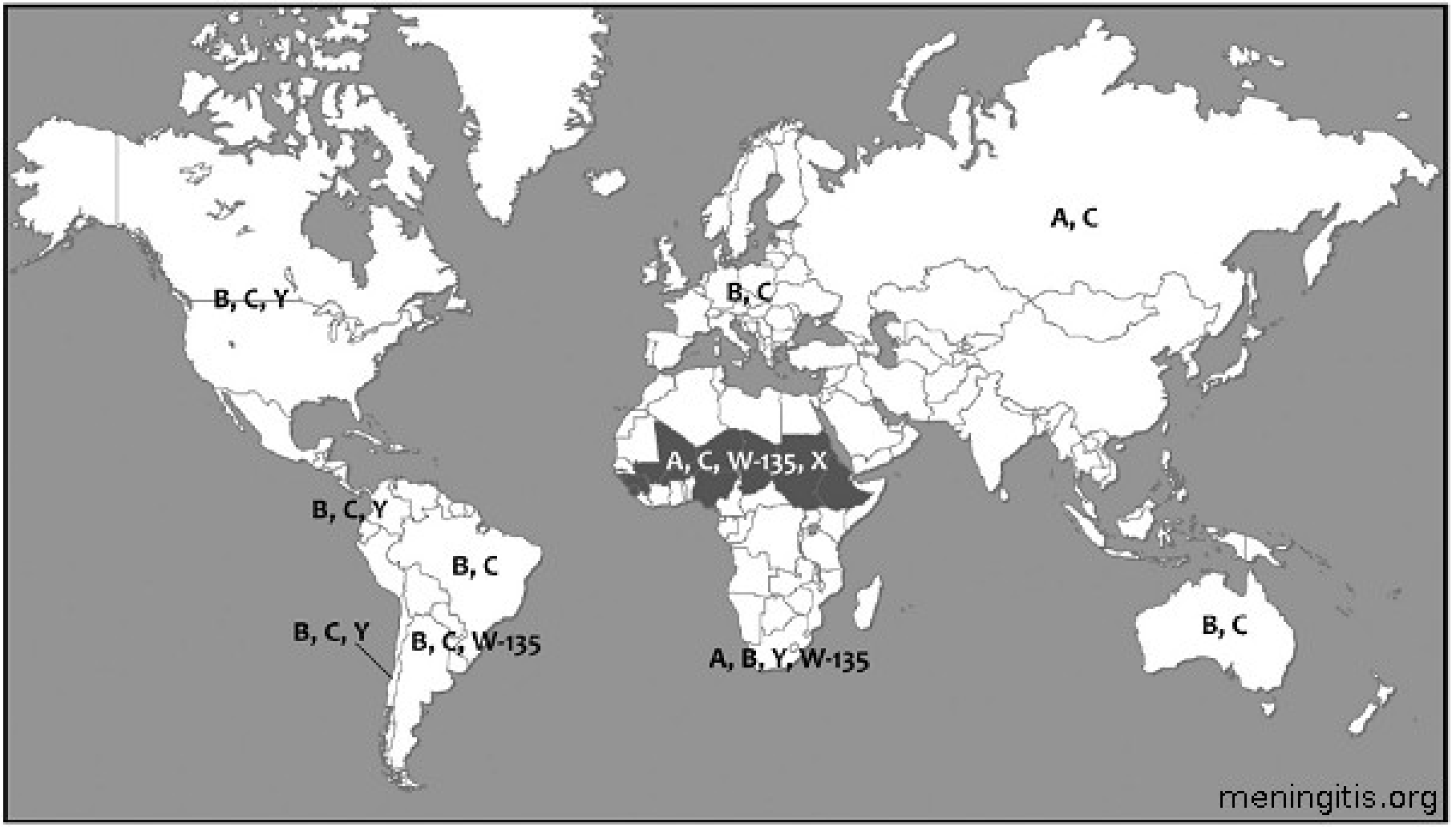


- **G– diplokok, tvar kávového zrna**, často intracelulárně (leukocyty)
- **původce kapavky**, infekce nezanechává trvalou imunitu → není možné očkování
- **citlivý na vnější vlivy** (přenáší se pouze pohlavně), nutné **omezit teplotní šok** (předehřáté medium, rychlý transport atp.)
- z důvodu citlivosti se **zasílají výtěry**: **ústí urethry**, **cervix** (nikoli pochva!), **rektum** (možný rezervoár infekce), v případě podezření výtěr z **faryngu**
- **kredeizace – prevenze novorozenecké keratokonjunktivitidy** (Septonex, dříve $AgNO_3$)

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 ¾ kmenů

Neisseria meningitidis (2)



- „meningitis belt“ v Africe

„Ústní“ neisserie

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

Srovnání neisserií

	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
„ústní" neisserie	**nejméně choulostivé**	roste i na chudém krevním agaru

Rod *Moraxella*

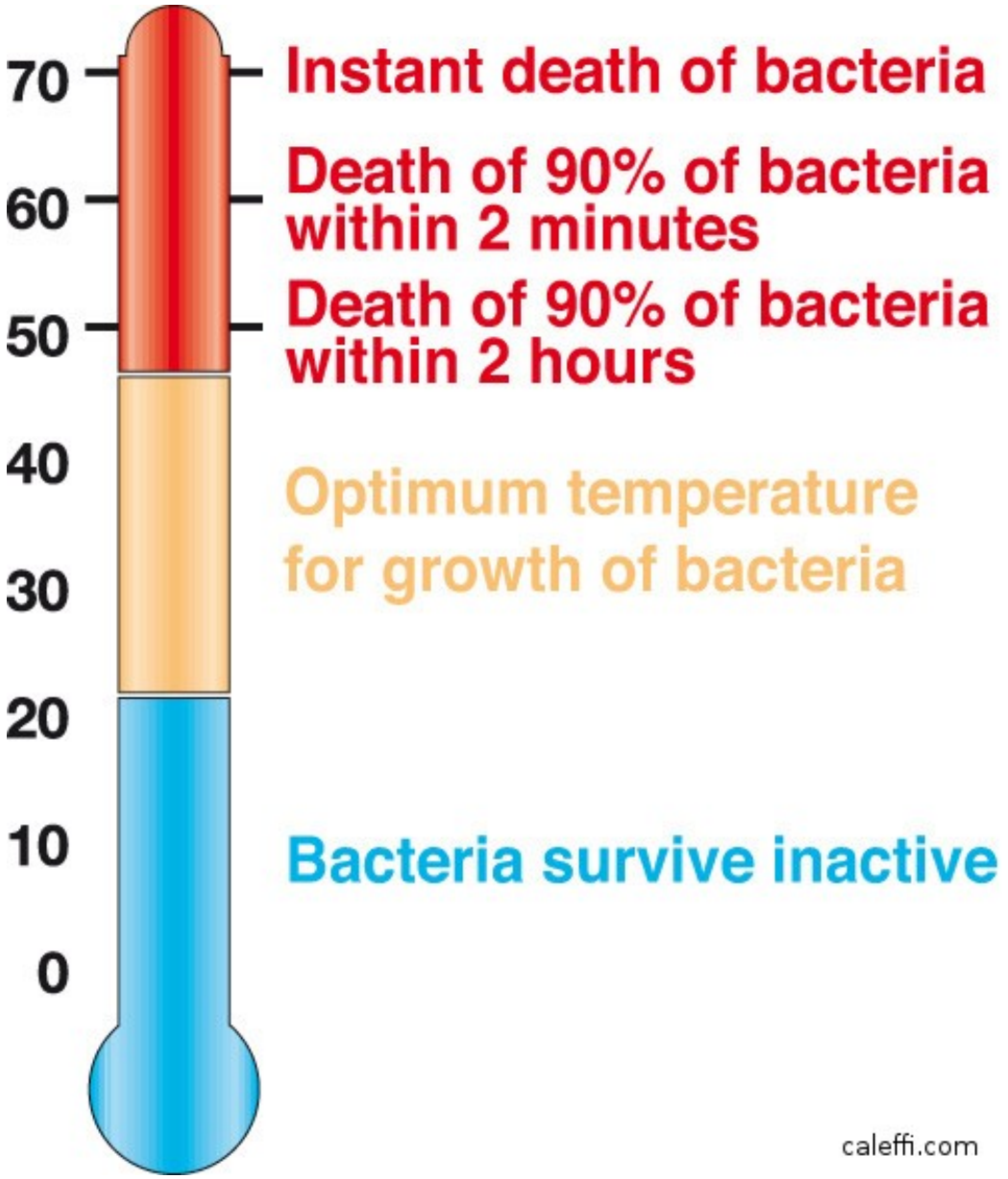
- krátké tyčky, kokobacily, ***M. catarrhalis*** **diplokok**
- **KAT+, OXI+, INAC+** (indoxylacetátový test)
- sliznice nasofaryngu, spojivkového vaku, genitální trakt
- ***Moraxella catarrhalis*** (dříve rod *Branhamella*):
  - záněty HCD u dětí (sinusitis, otitis media)
- ***Moraxella lacunata***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

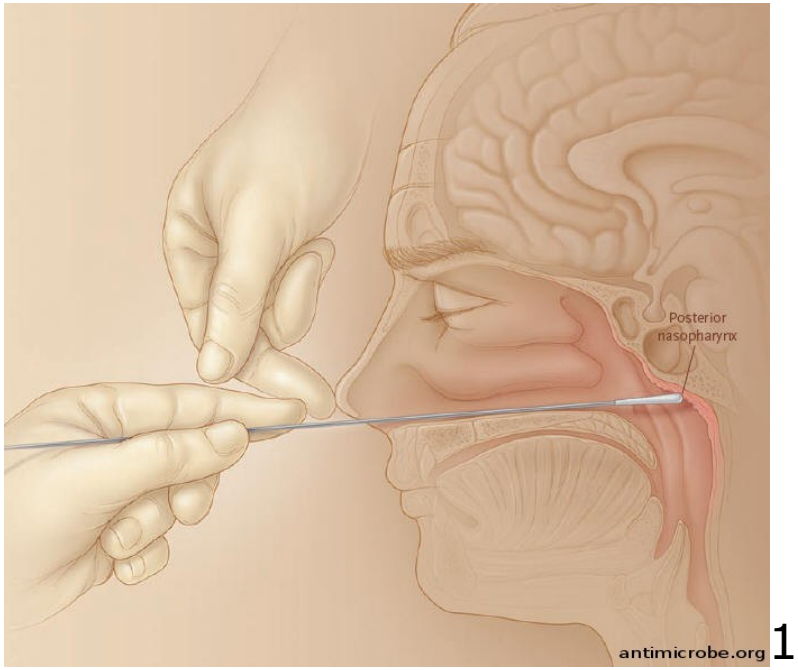
- **rezervoár ve vodovodech**, klimatizaci, atp. → nutné pečlivé plánování vodovodní sítě
- **přenos inhalací kontaminovaného aerosolu**
- **průkaz antigenu v moči**

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 organizmu 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**

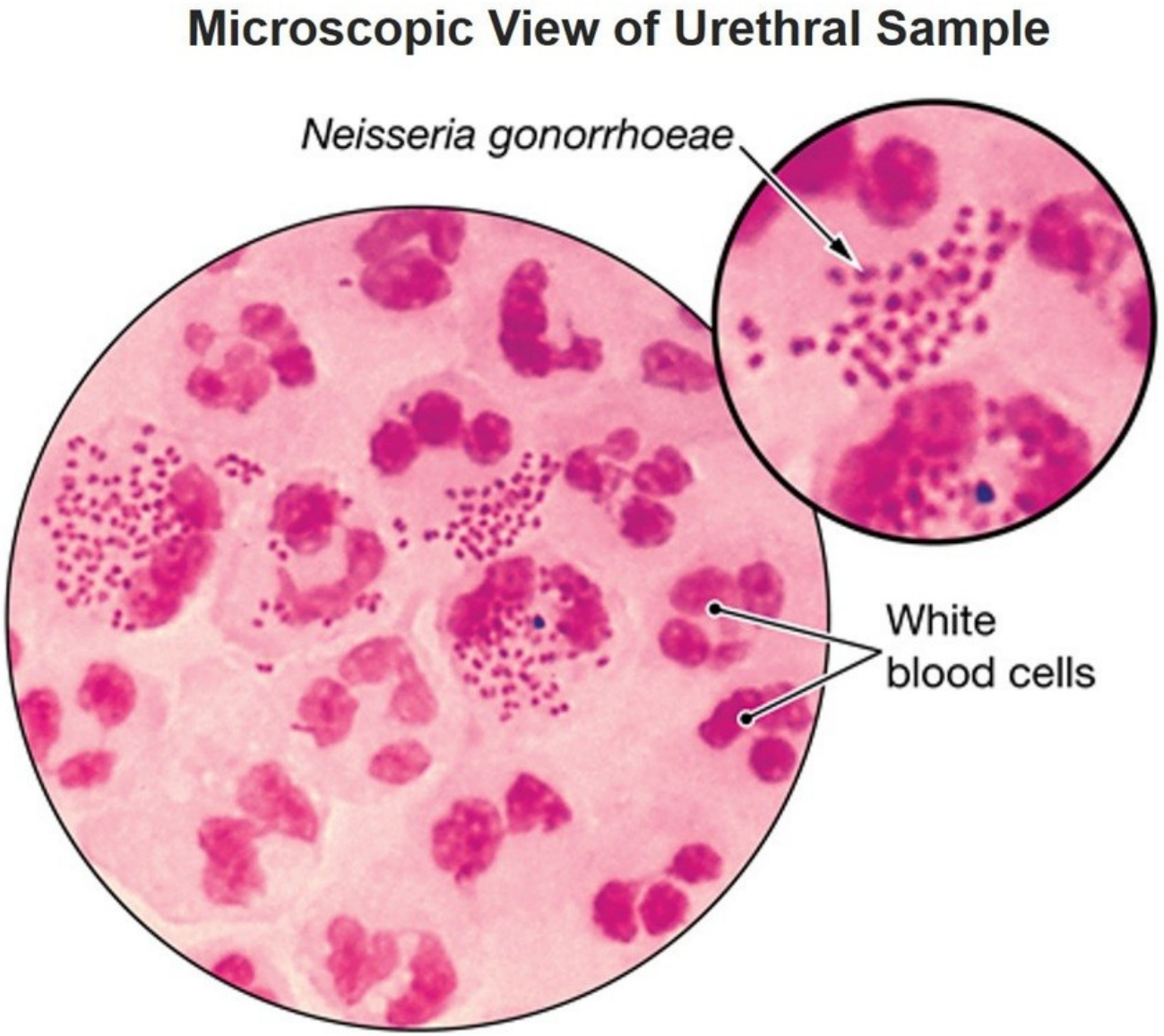
Diagnostika „jiných G– tyček“

- **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



Úkol 2: Kultivace na agarových půdách

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

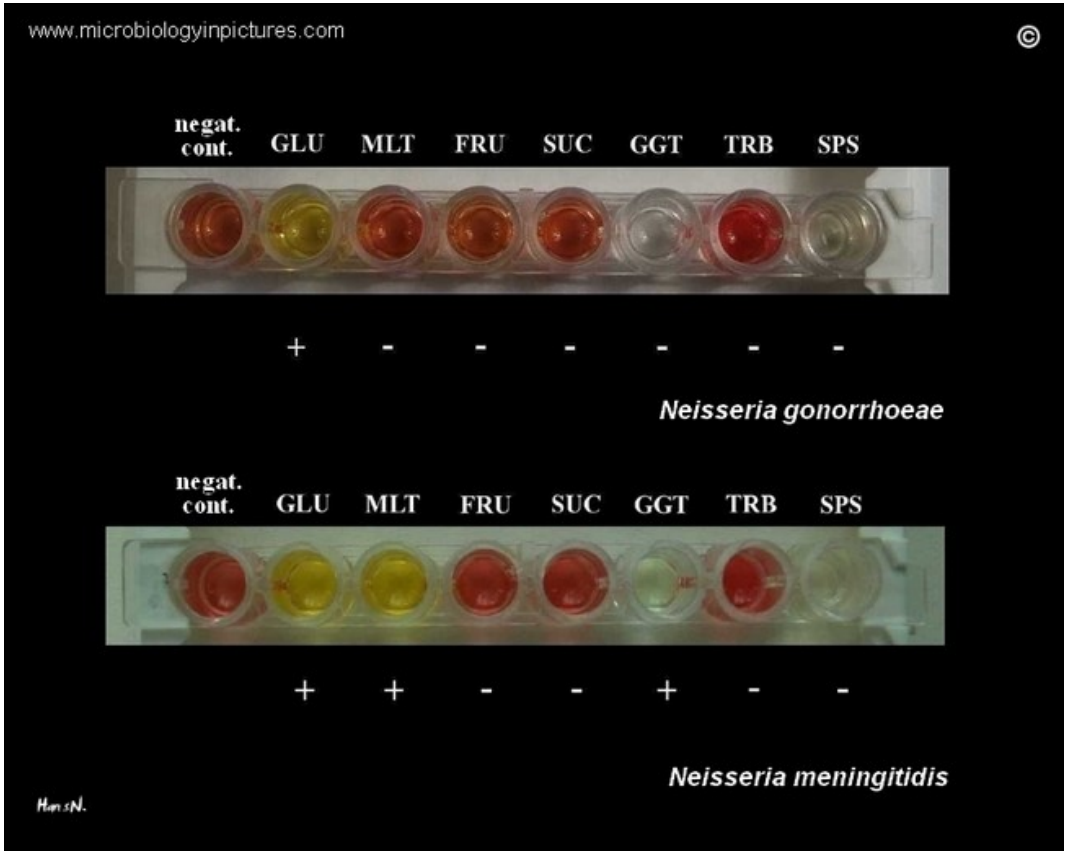
	KA	KA+	ČA
gonokoky	**NE**	**NE**	**ANO**
meningokoky	**NE**	**ANO**	**ANO**
ústní neisserie a moraxelly	**ANO**	**ANO**	**ANO**

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 naších 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

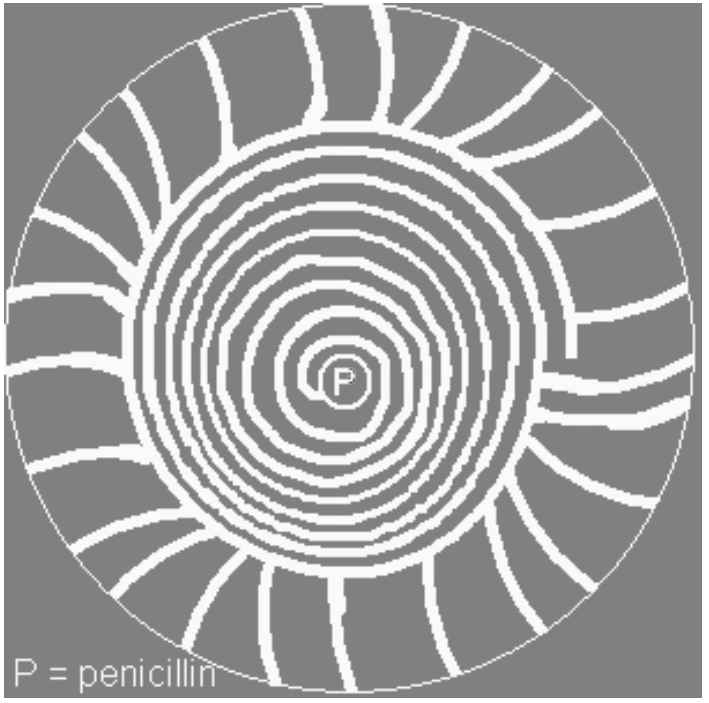
- vyhodnoťte diskové difúzní testy meningokoků a gonokoků
- *Moraxella catarrhalis* vzhledem k hraniční patogenitě odečítat nebudete

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



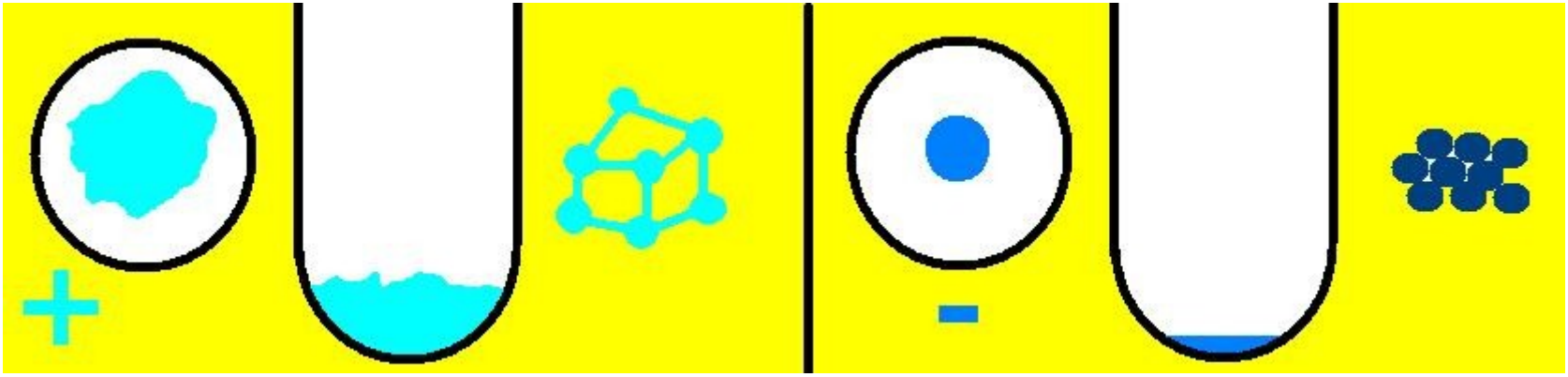
Úkol 7: Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel

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

některé legionely fluoreskují v UV světle

Úkol 7: Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel

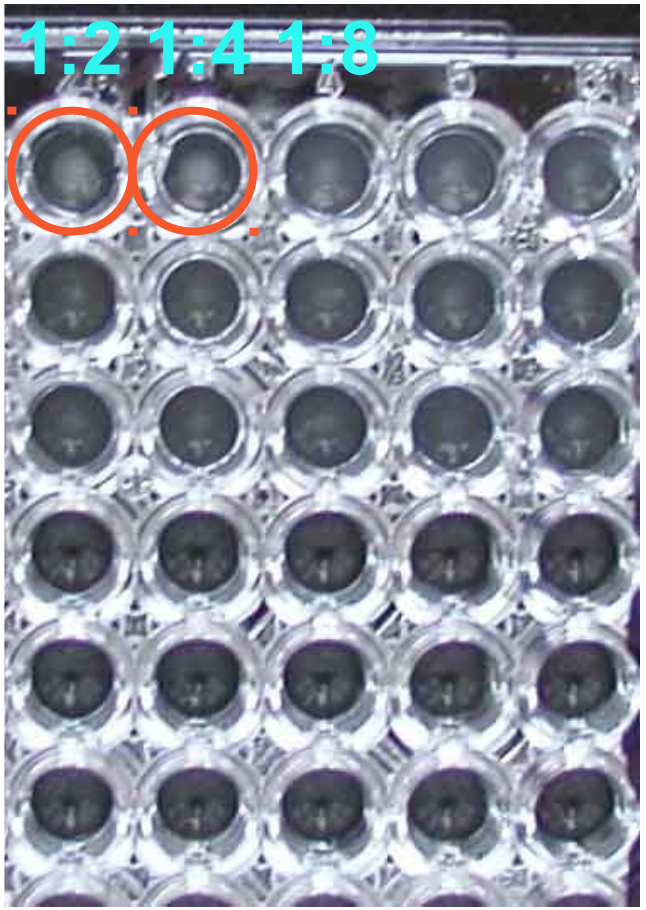
- **úkol 7c: Průkaz protilátek proti tularémii**
  - **aglutinace je mapovitý povláček** na dně důlku (buňky jsou provázány protilátkami)
  - **negativní** reakce je **kompaktní pravidelná tečka** (sedimentované bakteriální buňky)



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