

Téma P06: Diagnostika některých dalších gramnegativních bakterií (*Neisseria, Moraxella, Bordetella, Legionella, Francisella.....*)

Ke studiu: *Haemophilus, Neisseria, Moraxella, Bordetella, Legionella, Francisella* (učebnice, WWW...)

Z jarního semestru: Mikroskopie, kultivace, biochemická kultivace, aglutinace

Tabulka pro hlavní výsledky úkolů 1 až 4 (k postupnému vyplnění):

Kmen		K	L	M	N	P
Gramovo barvení kmene – Úkol 1b						
Kultivace Úkol 2	“Chudý” KA (“KA”) Růst A/N					
	“Bohatý” KA (“KA+”) Růst A/N					
	Čokoládový agar Růst A/N					
	Popis kolonií na KA+*					
Úkol 3	a) Oxidázový test (+/-)					
	b) Indoxylacetátový (INAC) test					
KONEČNÝ ZÁVĚR (výsledek úkolu 4 – NEISSERIA test, resp. úkolu 1 pro kmen který není gramnegativním kokem)						

*U bakterií nerostoucích na KA+ použijte výsledek růstu na ČA

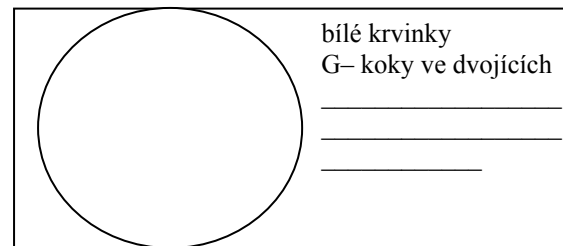
Úkol 1: Mikroskopie klinického vzorku a mikroskopie kmene

a) Pozorování uretrálního nátěru u kapavky

Prohlédněte si Gramem barvený nátěr.

Nevšímejte si jen bakterií, ale také buněk makroorganismu, zejména leukocytů. Pověšimněte si, že koky nejsou přítomny v každém leukocytu. Zakreslete, a spojte popisky objektů s pozorovanými objekty na obrázku.

Poznámka: Velmi podobně by také vypadala mikroskopie u hnisavého mozkomíšního moku v případě akutní meningokokové meningitidy.



b) Mikroskopie suspektních kmenů – hledání

G- koků

Na stole máte sklíčka s kmeny obarvenými podle Grama. Prohlédněte je a zapište výsledky do tabulky. Kmen, který není G- kokem, nebude studován v úkolech 3 a 4; ve druhém úkolu si jej však pro srovnání popište také.

Úkol 2: Kultivace na agarových půdách

Zapište do tabulky, které bakterie rostou na „chudém KA“, „bohatém KA“ a na čokoládovém agaru. Ústní druhy neisserií stejně jako moraxely a většina G+ koků rostou i na chudším krevním agaru. *Neisseria meningitidis* („meningokok“) roste jen na bohatších krevních agarech. *Neisseria gonorrhoeae* (gonokok) na krevním agaru neroste vůbec, je nutný čokoládový agar. Poté popište kolonie všech kmenů na KA+, jen kmen, který tam neroste, popište na ČA. Výsledky zapište do tabulky.

Úkol 3: Základní biochemické testy u G- koků

Oba testy budou prováděny demonstračně na bočním stole. Zapište výsledky do tabulky.

a) Oxidázový test k odlišení neisserií a moraxel od případných jiných G- koků

Učitel se dotkne několika kolonií kmenů identifikovaných jako G- koky oxidázovým diagnostickým papírkem. V případě pozitivity se během několika vteřin objeví modré zbarvení. Zakreslete a zapište výsledky do tabulky.

+ -

b) Indoxylacetátový test k odlišení *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* od neisserií

Postup je podobný jako u oxidázového testu, ale proužek musí být předem zvlhčen, místo modré barvy pozorujete barvu modrozelenou a výsledek není viditelný okamžitě, ale je třeba několik minut počkat. Zakreslete pozitivní a negativní výsledek a zapište výsledky do tabulky.

+ -

Úkol 4: Druhá diagnostika neisserií a moraxel (branhamel) biochemickými testy

U kmenů určených jako G– koky odečtete biochemický mikrotest (NEISSERIAtest fy Lachema) naočkovaný předchozí den. Odečtete podle schématu. První jamka obsahuje negativní kontrolu (NEC), takže vlastní test začíná až od DRUHÉ jamky! Zakápnutí Lugolovým roztokem již bylo provedeno, nemusíte je provádět sami. Povšimněte si nízké biochemické aktivity některých neisserií. Porovnejte výsledek s růstovými vlastnostmi (kmen určený jako gonokok by měl růst pouze na čokoládovém agar, meningokok pouze na čokoládovém a bohatém krevním agaru).

Kmen:	H	G	F	E	D	C	B	A				
	NEC										Kód:	Identifikace:
	×	1	2	4	1	2	4	1				
	×											
Kmen:	H	G	F	E	D	C	B	A				
	NEC										Kód:	Identifikace:
	×	1	2	4	1	2	4	1				
	×											
Kmen:	H	G	F	E	D	C	B	A				
	NEC										Kód:	Identifikace:
	×	1	2	4	1	2	4	1				
	×											
Kmen:	H	G	F	E	D	C	B	A				
	NEC										Kód:	Identifikace:
	×	1	2	4	1	2	4	1				
	×											

Úkol 5: Test citlivosti G- koků na antibiotika

Na stole naleznete difusní diskové testy citlivosti na antibiotika u kmenů, které jste určili jako G– koky a které patří k patogenním druhům. U *Moraxella catarrhalis* vzhledem k pouze hraniční patogenitě test odečítat nebudete. Pro všechny testované kmény změřte zóny citlivosti. V protokolu máte napsány hraniční zóny – podle nich interpretujte zóny vámi zjištěné jako citlivé (C), rezistentní (R) a případně intermediární (I).

a) Citlivost meningokoka (kmen ___) k antibiotikům

Aktuálně se testuje u meningokoka citlivost k penicilinu E-testem a ostatní citlivosti difusním diskovým testem.

Antibiotikum (hodnoty breakpointu v µg/ml)	MIC (µg/ml)	Interpr.	Antibiotikum (hranice v mm)	Ø zóny (mm)	Interpretace
Penicilin (P) C ≤ 0,06 R > 0,25			Cefotaxim (CTX) C ≥ 34 R < 34		
			Meropenem (MEM) C ≥ 30 R < 30		
			Azithromycin (AZM) C ≥ 20 R < 20		
			Ciprofloxacin (CIP) C ≥ 35 R < 33		

b) Citlivost gonokoka (kmen ___) k antibiotikům

Aktuálně se testuje u gonokoka citlivost k penicilinu a cefotaximu E-testem a ostatní citlivosti difusním diskovým testem.

Antibiotikum (hodnoty breakpointu v µg/ml)	MIC (µg/ml)	Interpr.	Antibiotikum (hranice v mm)	Ø zóny (mm)	Interpretace
Penicilin (P) C ≤ 0,06 R > 1			Cefuroxim (CXM) C ≥ 31 R < 26		
Cefotaxim C ≤ 0,12 R > 12			Azithromycin (AZM) C ≥ 25 R < 25		
			Tetracyklin (TE) C ≥ 38 R < 30		
			Ciprofloxacin (CIP) C ≥ 41 R < 28		

Úkol 6: Přímý průkaz antigenů původců meningitid v mozkomíšním moku (demonstrace diagnostické soupravy a videoklip)

Meningokoková meningitida je závažná choroba. Nelze zde čekat na kultivaci, je nutno využít rychlých diagnostických metod. Vedle mikroskopie se zde využívá především latexové aglutinace.

a) Demonstrace soupravy k latexové aglutinaci

Prohlédněte si soupravu a zapište názvy mikrobů, které mohou být touto metodou diagnostikovány.

b) Videoklip

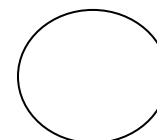
Prohlédněte si videoklip. V této ukázce se jako patogen projevil _____

Úkol 7: Diagnostika bordetel, brucel, legionel a francisel

a) Diagnostika bordetel

Diagnostika pertuse je v současnosti založena na serologii (aglutinace a ELISA), která vždy vyžaduje dva vzorky séra. Jinou diagnostickou metodou je PCR. Nicméně důležitou a klasickou metodou stále zůstává kultivace.

Existuje speciální médium pro druh *Bordetella pertussis* a speciální způsob očkování na tuto půdu. Na rozdíl od mnoha jiných bakterií je *Bordetella* rezistentní k penicilinu. Proto začínáme kápnutím kapky penicilinového roztoku doprostřed misky s agarem. Výtěr je smíchán s kapkou a očkován ve směru spirály. Poté jsou očkovány radiální paprsky kličkou. Napište název půdy a zakreslete postup očkování podle obrázku.



Název půdy: _____

b) Demonstrace kultivační půdy na legionely

Prohlédněte si kultivační půdu na legionely. Zapište o ní několik údajů.

Zkratka	Co znamenají jednotlivá písmena ve zkratce	Barva půdy

c) Průkaz protilátek proti tularémii

Na bočním stole je vlhká komůrka s výsledky nepřímého průkazu francisel aglutinací. Jamky s pozitivní reakcí vykazují příslušnost aglutinátu (větší terčík nepravidelného tvaru), důlky s negativní reakcí ukazují sedimentaci bakterií (menší, výrazně bílé kulaté kolečko). První důlek je „technický“, dále za čarou následují titry 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 atd. Pokuste se o závěrečnou interpretaci, víte-li, že jakýkoli titer se považuje za „suspektní“, samozřejmě jen pokud nejde o pozitivní kontrolu. Doplňte do následující tabulky:

		Interpretace: Jakýkoli titer se považuje za suspektní, při rozhodování o léčbě je nutno vzít v úvahu klinický stav pacienta.
		Interpretace:
K+		TITR = 1: _____
1		TITR = 1: _____
2		TITR = 1: _____
3		TITR = 1: _____

d) Diagnostika protilátek proti brucelóze

Diagnostika brucelózy (Bangova choroba – způsobena *B. abortus*) byla provedena nepřímým průkazem – metodou ELISA ve třídách IgG i IgM. Absorbance byla změřena spektrofotometrem a výsledky byly expertním systémem přímo vyhodnoceny jako „pozitivní“, „hraniční“ či „negativní“. Výsledky najdete na stole. Pokuste se o konečný závěr k jednotlivým pacientům.

Pacient	Výsledek IgM	Výsledek IgG	Konečný závěr
Alice			
Bob			
Claudia			
David			

Poznámka: Brucelóza je vzácnou nemocí, pročež řada laboratoří včetně té naší diagnostiku neprovádí. Z tohoto důvodu pracovní listy použité pro tento úkol nejsou skutečné, ale jsou to upravené pracovní listy z jiné serologické reakce. Nicméně skutečné pracovní listy pro

diagnostiku brucei by vypadaly stejně či velmi podobně.