



Středoškolská technika 2010

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

NOSIČSTVÍ NEISSERIA MENINGITIDIS U ŽÁKŮ STŘEDNÍCH ŠKOL

Nikola Macháčková, Šárka Kotlářová, Božena Trejtnarová, Lenka Radoňová

Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola,
Hradec Králové, Komenského 234

SHRNUTÍ

► Tato práce se zabývá problematikou nosičství nebezpečné patogenní bakterie *Neisseria meningitidis* u žáků středních škol.

► Náš vlastní výzkum byl rozdělen do tří navzájem se prolínajících fází.

V první fázi jsme se věnovaly získávání základních informací o bakterii *Neisseria meningitidis* a onemocnění, které vyvolává, tj. zánětu mozkových blan.

V druhé fázi jsme započaly vlastní praktický výzkum sestávající z provádění výtěrů dutiny ústní u děvčat a chlapců ve věku 15 až 19 let a následné kultivace a diagnostiky získaných bakteriálních kultur.

Třetí fázi bylo zpracovávání získaných dat, jejich kategorizace, vyhodnocení a zpracování tabulek a grafů.

► Naše práce byla zaměřena na průkaz bakterií druhu *Neisseria meningitidis* a její nosičství na sliznici a statistické vyjádření získaných hodnot. Nosičství jsme zjistili u 7 % žáků středních škol.

1. Úvod

K této práci nás přivedla kazuistika mladého chlapce, který náhle onemocněl meningitidou a zemřel. Zajímalo nás, kolik zdravých bacilonosičů se vyskytuje mezi našimi vrstevníky.

Podnětem vedoucím ke vzniku této práce pro nás bylo letmé, přesto poutavé dotknutí se této problematiky při výuce na VOŠZ a SZŠ Hradec Králové. Zde jsme získaly první informace a podklady. Následně jsme se rozhodly provést na tomto poli vlastní výzkum.

Pod vedením odborného konzultanta jsme provedly řadu stěrů z ústní sliznice studentů středních škol v Hradci Králové.

Všechny vyšetřované jsme seznámily s výkonem a možnými riziky. Vyšetřovaní žáci dobrovolně přistoupili k vyšetření a podepsali informovaný souhlas s provedením výtěru ústní dutiny. Vyšetření bylo prováděno anonymně.

2. Teoretický základ práce

2.1. Základní informace

Neisseria meningitidis je typickým původcem bakteriálních meningitid, hlavně u adolescentů nebo mladistvých. Meningokoky jsou rozšířeny po celém světě. V České republice jsou příčinou meningitid hlavně antigenní typy A a B. *Neisseria meningitidis* je pouze lidský patogen. Nákaza se šíří kapénkovou infekcí. Inkubace je několik hodin až 3 dny. Po usazení *Neisseria meningitidis* v nosohltanu může dojít k lehkému zánětu, ale často je pacient bez obtíží. U některých pacientů dojde k přesunu bakterií do krve a následně do mozkomíšního moku. Není zcela jasné, které faktory podporují další rozvoj infekce. Zřejmě svou roli hraje virulence kmene a stav imunologické reaktivity člověka (imunologický deficit i nespecifikované změny v imunologické reaktivitě při mimořádné fyzické i psychické zátěži). Onemocnění vzniká náhle vysokou horečkou, třesavkou a rozvojem meningeálních příznaků. Někdy může být průběh onemocnění tak rychlý, že dojde ke smrti bez rozvinutí typických klinických příznaků. *Neisseria meningitidis* je kultivačně náročná. Roste na speciálních kultivačních půdách v podobě lesklých průhledných kolonií. *Neisseria meningitidis* je dobře citlivá na antibiotika. K léčení se používá penicilinová, popřípadě cefalosporinová řada.

2.2. Epidemiologie

Zdrojem nákazy je infikovaný nemocný nebo nosič *Neisseria meningitidis*. Nosič je osoba, která sama nevykazuje klinické známky infekce, přestože je daným bakteriálním kmenem kolonizována. Nosičství je nejčastěji na sliznici dýchacích cest, zvláště klenby nosohltanu.

Nákaza se přenáší vzdušnou cestou, vzácně i čerstvě potřísněnými předměty (přístroje, nádoby, hračky).

Nosičství může přetrvávat týdny, měsíce, roky a může být také intermitentní a tedy mikrobiologicky obtížně odhalitelné.

3. Metodika, materiál

Výtěry krku jsme prováděly u chlapců a dívek naší věkové kategorie. Děvčata byla žákyně Vyšší odborné školy zdravotnické a Střední zdravotnické školy v Hradci Králové.

Chlapci byli žáci Střední průmyslové školy a Střední odborné školy a Středního odborného učiliště v Hradci Králové. Odběry biologického materiálu byly předem domluveny vedením obou škol. Odběry jsme prováděly za dodržení BOZP, v ochranném plášti, ústence a v ochranných gumových rukavicích. Žáky jsme poučily o účelu odběru a požádaly jsme je, aby podepsali informovaný souhlas s odběrem. Samotný výtěr probíhal bez problémů. Požádaly jsme dotyčné, aby co nejvíce otevřeli ústa, vyplázli jazyk a pokusili se říci „A“ nebo „E“. Poté jsme setřely mandle nebo patrové oblouky a nanesly jsme výtěr ihned na kultivační půdu. Půdy se zhotovenými nátěry jsme musely důkladně tepelně zabezpečit kvůli transportu do laboratoře, neboť venkovní teplota v té době byla kolem 0 °C.

Konečný počet získaných vzorků byl 243.

Neisseria meningitidis se musí kultivovat v CO₂ prostředí, a tak jsme kultivační půdy vložily do nádoby s víkem, kde jsme zapálily svíci a čekaly, až zhasne. Poté jsme půdy vložily do termostatu. Po 24 a znova po 48 hodinách jsme vyhodnotily růst kolonií. Protože jsme použily selektivní půdu, rostly zde pouze neisserie. Dále jsme ověřily neisserie oxitestem a Gramovým barvením. *Neisseria meningitidis* je gramnegativní diplokok. V případě pozitivního výsledku jsme provedly Neisseriatest, který jsme odečítaly po 24 hodinách kultivace v termostatu.

3.1. Metodika

3.1.1. Odběr vzorku z dutiny ústní

Provedení: opatrně zavedeme tampon do dutiny ústní, vyhneme se kůži, vytřeme patrové oblouky, příp. mandle; jedním tamponem je možné provést stěr z obou patrových oblouků.

Pro stěr se užívá sterilní vatový tampón (MEUS s. r. l., Plove di Sacco, Italy; pro ČR distribuuje JK TRADING s. r. o., Brno, Czech Republic).

3.1.2. Kultivace

Biologický materiál jsme ihned po stěru odběrovým tamponem nanesly na kultivační půdu GO agar. Naočkované půdy jsme umístily do samostatného termostatu a kultivovaly při 37 °C za zvýšené tenze CO₂. Odečítaly a kontrolovaly jsme je opakovaně, a sice po 24 a 48 hodinách.

Narostlé kolonie jsme určily oxitestem, Gramovým barvením a Neisseriatestem.

3.1.3. Mikroskopická identifikace

Preparát barvený dle Grama

Barvení dle Grama je nejpoužívanější barvení v mikrobiologii. Informuje o počtu a tvaru bakterií, jejich uspořádání a barvitelnosti dle Grama, což má diagnostický význam. Rozliší bakterie na grampozitivní (modré) a gramnegativní (červené). Tato metoda barvení se opírá o skutečnost, že vytvořený komplex krystalové violeti a Lugolova roztoku po oplachu alkoholem zůstává pouze v grampozitivních bakteriích, z gramnegativních bakterií se alkoholem vymyje. Toto je dáno odlišnostmi ve stavbě stěny grampozitivních a

gramnegativních bakterií. Gramnegativní bakterie jsou po oplachu alkoholem bezbarvé a musejí se kontrastně dobarvit, např. karbolfuchsinem nebo safraninem.

Provedení:

1. označení podložního skla a sterilizace
2. nanesení suspenze bakterií
3. fixace preparátu protažením plamenem kahanu
4. převrstvení barvicími roztoky
 - a. krystalová violet 30 s
 - b. Lugolův roztok 30 s
 - c. oplach vodou
 - d. diferenciací ethanolem – oplachujeme, dokud odtéká barva
 - e. oplach vodou
 - f. kontrastní dobarvení safraninem 60 s
 - g. oplach vodou
5. hodnocení mikroskopicky imerzním systémem, zvětšení 1000krát.

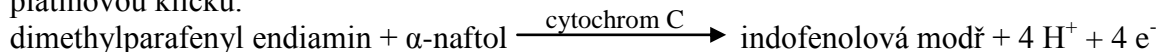
3.1.4. Testy pro určení bakteriálního druhu *Neisseria meningitidis*

3.1.4.1. MIKROLATEST® OXItest

(výrobce: PLIVA-Lachema Diagnostika s. r. o., Brno, Czech Republic)

Detekční proužky

Detekční proužky OXItest jsou určeny pro detekci bakteriální cytochromoxidázy. Přítomnost tohoto enzymu je detekována barevnou reakcí N,N-dimethyl 1,4-fenylendiaminu s α -naftolem za vzniku indofenolové modři. Za oxidaci či redukci cytochromů je odpovědné železo, obsažené v molekule cytochromu, proto pro provedení testu je nutné použít plastickou nebo platinovou kličku.



Provedení: dle návodu k diagnostickým proužkům

Hodnocení: dle návodu k diagnostickým proužkům

3.1.3.2. MIKROLATEST® NEISSERIAtest

(výrobce: PLIVA-Lachema Diagnostika s. r. o., Brno, Czech Republic)

Set biochemických testů k druhové identifikaci bakterií

Identifikační souprava NEISSERIAtest je určena pro identifikaci klinicky významných neisserií, především *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* a *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. Souprava je umístěna na krátkém 8jamkovém stripu dělené mikrotitrační destičky. Výsledky se hodnotí předběžně po 4hodinové inkubaci, definitivní odečtení se provádí po 24 hodinách.

Testy: glukóza, maltóza, fruktóza, sacharóza, γ -glutamyltransferáza, tributyrin, syntéza polysacharidů

Provedení: dle návodu k setu

Hodnocení: dle návodu k setu

3.2. Materiál

3.2.1. Kultivační média

GO agar s ATB

(výrobce: TRIOS, spol. s r. o., Hradec Králové, Czech Republic)

- Selektivní pevná půda

3.2.2. Roztoky a činidla

3.2.2.1. Barvení dle Grama

- roztok krystalové violeti – krystalová violet' (5g), 96% ethanol (200 ml)
- 1% vodný roztok šťavelanu amonného (800 ml)
- Lugolův roztok – jód (1g), 1% vodný roztok KI (200 ml)
- 70% vodný roztok ethanolu
- roztok safraninu - 1% vodný roztok

3.2.2.2. Standard 1. stupeň zákalové stupnice dle MacFarlanda

- 0,1 mol l-1 H₂SO₄ (9,90 ml) + 0,05 mol l-1 BaCl₂ (0,10 ml)

3.2.3. Přístroje a pomůcky

Termostat 37 °C, chladnička 4 °C, bakteriologické kličky, plynový kahan, dezinfekční přípravek, laboratorní sklo.

3.2.4. Likvidace použitého materiálu

Nakládání s odpadem zdravotnických zařízení upravuje

- zákon o odpadech č. 185/2001 Sb., v platném znění, který zařazuje odpad podle seznamu nebezpečných látek

- vyhláška MZČR č. 381/2001 Sb.

- katalog odpadů

- vyhláška MZČR č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady

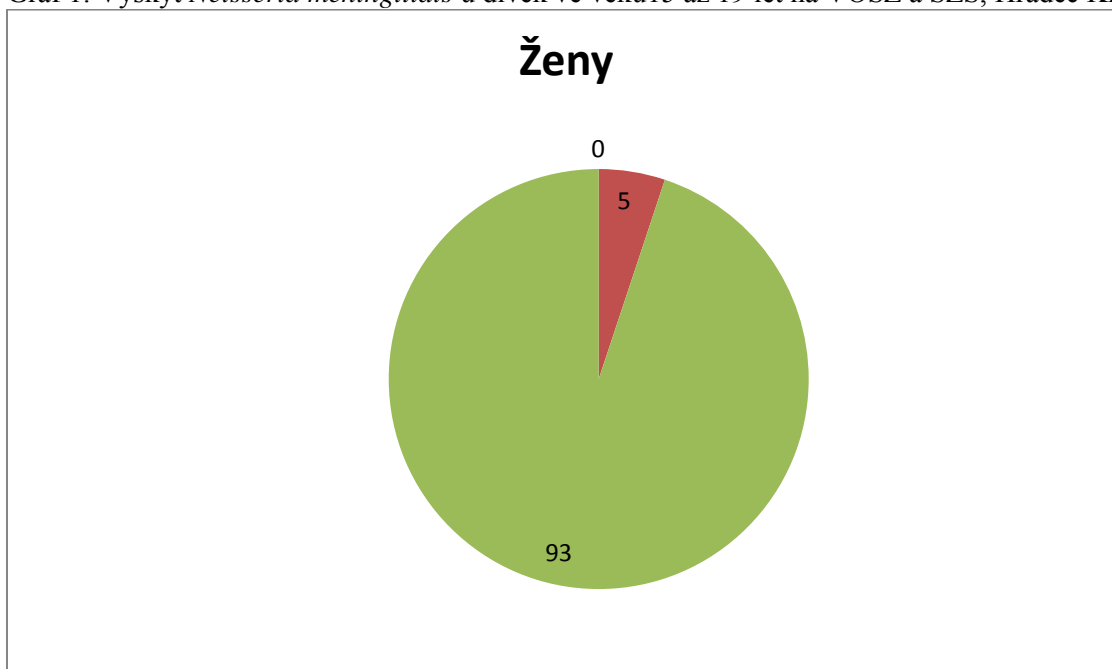
- nařízení vlády č. 197/2003 Sb., o plánu odpadového hospodářství ČR

4. Výsledky

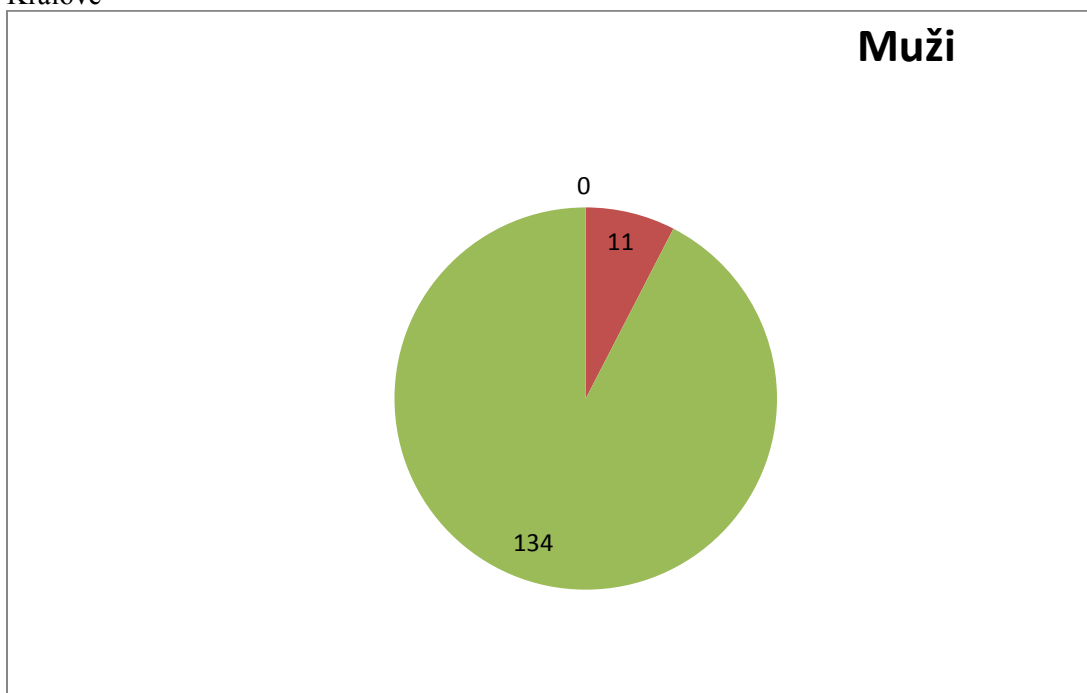
Po provedení všech praktických úkonů a vyhodnocení všech testů jsme dostaly následující výsledky:

Provedly jsme celkem 243 výtěrů z dutiny ústní u žáků středních škol ve věku 15 až 19 let. Zachytily jsme 16 pozitivních vzorků na přítomnost *Neisseria meningitidis*, což je 7 % pozitivních. U chlapců ze 145 vyšetření jsme zachytily 11 pozitivních na přítomnost *Neisseria meningitidis*, což je 7,6 % (graf 2). U děvčat jsme vyšetřily 98 výtěrů, pozitivních na *Neisseria meningitidis* bylo 5 vzorků, což je 5 % (graf 1). Z jiných druhů rodu *Neisserie* jsme zachytily: *N.gonorrhoeae*, *N.cinerea,elongata*, *N.sica*, *N.subfalava*, *N.lactamica*, *N.catarralis* a neidentifikovatelné *neisserie* (graf 3).

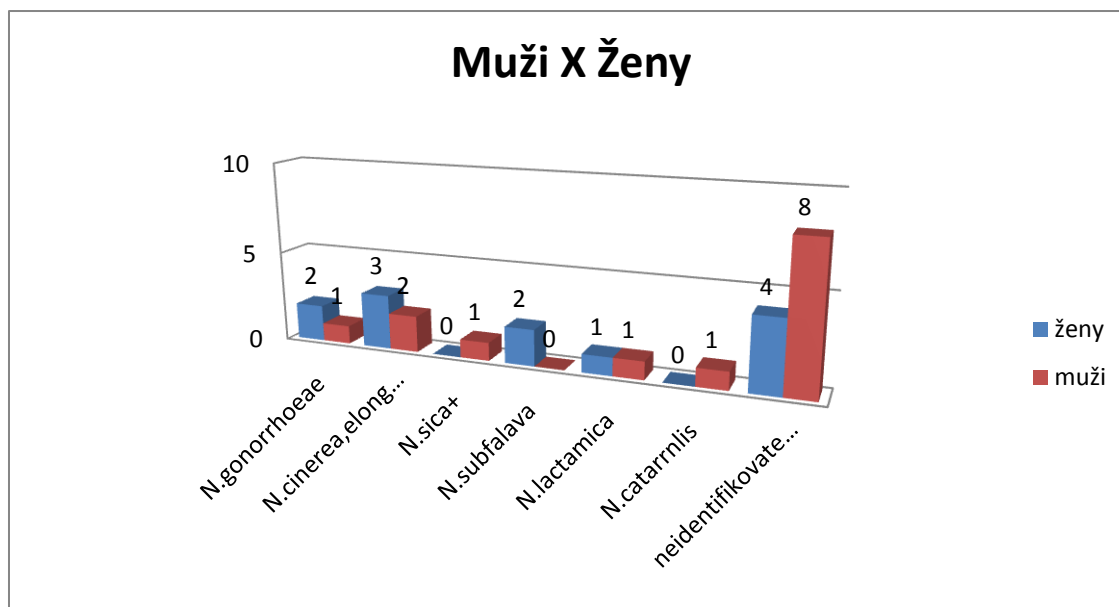
Graf 1. Výskyt *Neisseria meningitidis* u dívek ve věku 15 až 19 let na VOŠZ a SZŠ, Hradec Králové



Graf 2. Výskyt *Neisseria meningitidis* u chlapců ve věku 15 až 19 let na SPŠ a SOŠ a SOU Hradec Králové



Graf 3. Výskyt jiných druhů neisserií u dívek a chlapců ve věku 15 až 19 let na VOŠZ a SZŠ, Hradec Králové a SPŠ a SOŠ a SOU Hradec Králové



5. Diskuze

Rezervoárem bakterií je nosohltan inaparentních nosičů. Bartošová uvádí nosičství asi u 10 % zdravé populace. Incidence meningokokového onemocnění je 1-5/100 000 obyvatel. Pro vznik epidemií má velký význam koncentrace nosičů, stres a fyzická zátěž. V České republice byla v letech 1995/96 epidemie vyvolaná typem C. Od roku 2000 převažuje v České republice typ B.¹

Přítomnost *Neisseria meningitidis* ve výtěrech nosohltanu Havlík uvádí 15 %, udává, že se jedná o neinvazivní kmeny, které neohrožují svého hostitele ani okolí.² Beran ve své publikaci uvádí procento nosičů *Neisseria meningitidis* 1-15 %, stoupne-li toto procento nad 20 %, zvyšuje se pravděpodobnost vzniku epidemie.³

V našem výzkumu jsme zaznamenali 7 % nosičů, což je nepatrně méně, než uvádí literatura. Tento stav může být způsoben proočkováním populace. Bylo by zajímavé určit typ izolovaných *Neisserií meningitidis*.

6. Závěr

V našem výzkumu jsme provedly odběr výtěru krku u 243 žáků středních škol v Hradci Králové. Odebraný materiál jsme naizolovaly na selektivní kultivační půdu GO agar. Po 48 hodinách kultivace jsme vyhodnotily růst kolonií. Přítomnost neisserií jsme ověřily

¹ BARTOŠOVÁ, D.: *Dětské infekční nemoci*. Praha: Galén 2003. ISBN 80-7262-206-4.

² HAVLÍK, J. et. al.: *Infekční nemoci*. Praha: Galén 2002. ISBN 80-7262-173-4.

³ BERAN, J. et al.: *Očkování*. Praha: Galén 2005. ISBN 80-7262-361-3.

oxitestem a Gramovým barvením. Přítomnost *Neisseria meningitidis* jsme vyhodnotily Neisseriatestem.

Ve vzorku populace, který byl zastoupen v našem výzkumu, se podařilo zachytit nosiče *Neisseria meningitidis* v 7 %.

7. Seznam použité literatury

- BARTOŠOVÁ, D.: *Dětské infekční nemoci*. Praha: Galén 2003. ISBN 80-7262-206-4.
- BEDNÁŘ, M. a kol.: *Lékařská mikrobiologie*. 1. vydání. Praha, Marvil 1996.
- BERAN, J. et al.: *Očkování*. Praha: Galén 2005. ISBN 80-7262-361-3.
- BUDAYOVÁ, E. a kol.: *Vyšetřovací metody v klinické mikrobiologii a klinické imunologii*. Hradec Králové, Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové, 2004. ISBN 80-903414-0-3.
- GOPFERTO VÁ, D. et al.: *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena*. 3. vydání. Praha: Triton 2002, ISBN 80-7254-223-0-3.
- HAVLÍK, J. et. al.: *Infekční nemoci*. 2. vydání. Praha: Galén 2002. ISBN 80-7262-173-4.
- ZAHRADNICKÝ, J. a kol.: *Mikrobiologické vyšetřovací metody*. Osveta Martin 1981
- Centrum epidemiologie a mikrobiologie SZÚ, číslo 12. 2009. Praha, CEM STÚ Praha, 2009
- BUREŠ, M. ŠRŮTKOVÁ, P.: *Aerobní mikroflóra dutiny ústní psa se speciálním zaměřením na bakterie patogenní pro člověka*. VOŠZ a SZŠ Hradec Králové, Hradec Králové, 2007. – část o laboratorní diagnostice rodu *Neisseria*