MICROBIOLOGY

Microbiology Lab

DONE BY : Farah Bdair

Microbiology lab

السلام عليكم ورحمة الله.. السلايدات باللون **الأسود**، كلام الدكتورة باللون **الأزرق**

- The first thing that we going to discuss is CNS specimens:

•There are many specimens that can be taken from the central nervous system; cerebrospinal fluid (CSF), **brain abscess aspirates** or tissue biopsy samples. However, **CSF** is by far the most important, easily obtained sample by lumbar puncture.

the most important and easily obtained sample is the CSF.

طبعا في samples غيرها زي الbrain abscess aspirates & brain biopsy بنومدهم من الCNS بس كل وحدة منهم بتعتمد على الpathology، زي مثلا الbrain abscess aspirates واضح انه المرض هو الbrain abscess منعمل aspiration عشان نحاول نعمل culture ونعرف شو نستخدم بالعلاج

• The role of **brain biopsy** in the diagnosis of encephalitis has declined since the advent of PCR testing in CSF. However, it still has a place for patients in whom diagnosis has not been obtained following extensive investigation, particularly if there are focal abnormalities on imaging (tumors).

الbrain biopsy كانت تستخدم ولكن قل استخدامها بسبب انها very invasive + تم استبدالها بطرق أسهل منها زي الPCR testing for CSF وهاد ساعد انه نوصل للdiagnosis بشكل أسرع

- If we discovered some findings like a suspected tumor or suspected Parkinson's disease on CT or MRI and after extensive investigation we cannot reach to any diagnosis, the final solution is to do a brain biopsy.

• **Serum** samples can be obtained to help detect the cause of CNS infection.

It's not from the CNS but it can help us diagnose CNS infections

بسحبوا عينة دم من المريض وبحطوا الدم بالcentrifuge، بفصل مكونات الدم وبصيروا خلايا الدم تحت والserum اللي بحتوي على الclotting factors, antibodies, plasma بكون فوق

- Serum/blood samples:

•A **serum serology sample** can help in the diagnosis of certain CNS invading microorganisms:

اللي بهمنا من الserum واكثر اشي بساعدنا بتشخيص الCNS infection هو الserum serology sample

Serology means that we are looking in this serum sample for antibodies, examples:

- Mumps-specific IgM or IgG antibody titers from sera specimens.
- Serologic testing for measles-specific IgM or IgG titers
- Herpes simplex and Varicella-zoster (VZ) antibodies

- Neurosyphilis (VDRL/RPR in serum, detection of antibodies by fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-ABS) test)

• **Blood culture** can help aid the diagnosis, since some bacteria may circulate the blood during CNS infection (bacteremia). A blood culture can support the result of CSF culture.

For example, Neisseria meningitidis can cause CNS infection (meningitis) and at the same time it circulates the blood and cause meningococcemia (bacteremia)

يعني في عنا CSF culture نمت فيها Neisseria meningitidis وفي عنا blood culture برضو نمت فيها Neisseria meningitidis هاد بعطينا دليل قوي انه تشخيصنا صحيح وانه البكتيريا المسببة الmeningitis هي ال Neisseria meningitidis

- CSF sampling

How do we obtain it?

• Lumbar puncture

1. Clean the puncture site with antiseptic solution and alcohol before needle insertion to prevent introduction of infection.

2. Insert a needle at the L3-L4, L4-L5, or L5-S1 interspace (depending of the anatomy of the person we want to take the sample from him).

3. When the subarachnoid space is reached, the spinal fluid will appear in the needle hub.

After inserting the needle, it will reach the subarachnoid space and then the CSF will drain into tubes

عادة لما نوخد lumbar puncture منوخد 3-4 tubes (ع الأغلب ٣)

4. Slowly drain the CSF into the sterile leakproof tubes.

5. Three tubes are generally required for microbiology, hematology, and chemistry testing.

6. The first tube drawn will generally go to microbiology, and the last tube drawn will generally go to hematology.

في ترتيب محدد بحيث انه كل tube تروح لtest معين، يعني أول tube بروح للMicrobiology test مش للhematology or chemistry test لانه أول tube بكون أكثر اشي معقم لانه بالبداية

وآخر tube لازم يروح للhematology testing، لانه ممكن بالبداية الابرة تعمل trauma فبنزل الblood من هاي الtrauma بأول وثاني tubes والRBCs خلص بكونوا رايحين من الtrauma واخر tube بنزل فيه ال exact amount of RBCs in the CSF for us to count فما بنتج عنا false high count of RBCs

الchemistry tube ما بفرق ترتيبه بس كونه الأول للmicrobiology والأخير للhematology فهاد تلقائيا بكون الثاني.

• Contraindications of lumbar puncture:

- Possible raised intracranial pressure (ICP) with risk for cerebral herniation

حكيناها بالمحاضرات انه لو كان الضغط عند الbrain مرتفع واحنا دخلنا ابرة تحت هاد بقلل الضغط تحت ويصير الضغط كثير قوي فوق فممكن يأدي لانه الbrain & brainstem يندفعوا باتجاه الskull ويسببوا cerebral herniation ومن هاي الherniation يصير في damage للbrain & brainstem

So, we need to role out raised intracranial pressure or to know that the patient has increased intracranial pressure:

- **bulging fontanelle** is the most common sign in **children** when they have increased intracranial pressure

- **In adults:** 1- **testing optic disc** and see if the patient has **papilledema** or not

2- to role out any **mass effect** (if there is a tumor or hemorrhage increases the pressure on the brain) on CT or MRI (CT is faster than MRI in emergency)

- Thrombocytopenia or other bleeding diathesis, including ongoing anticoagulant therapy

Because it can cause continuous bleeding into the spinal canal or in the outside

- Suspected spinal epidural abscess

• LP is a relatively safe procedure, but minor and major complications can occur

- Post-LP headache
- Infection اذا ما كان المكان معقم
- Bleeding if there was thrombocytopenia
- Cerebral herniation if there was increased intracranial pressure
- Minor neurologic symptoms such as radicular pain or numbness if the entry of the needle was wrong, it may reach the nerves and cause radicular pain or numbness
- Back pain

ممكن تعمل back pain محل الspinal tap

After we obtain the CSF samples, we have 2 types of examinations:

- CSF macroscopic examination

من اسمها، منشوف الCSF بالعين المجردة

• Normal CSF appearance is clear and colorless زيه زي المي

• Macroscopic examination after LP:

o Color (bloody due to hemorrhage or traumatic tap)

حكينا انه الcolor لازم يكون clear، فإذا كان bloody هاد بدل انه في hemorrhage or traumatic tap

o Clarity (turbidity is nonspecific but indicates the presence of an underlying pathology or purulent bacterial meningitis)

o Viscosity (thick in severe purulent or cryptococcal meningitis)

حكينا انه بكون زي المي، فإذا كان thick معناها هاد دليل قوي انه الpatient عنده severe purulent or cryptococcal meningitis

o Presence of clots (elevated proteins due to TB meningitis)

ارتفاع البروتينات بسبّب clots، وارتفاع البروتينات من أعراض الTB meningitis

هاي الأشياء ما بتعطي تشخيص دقيق للأمراض هاي لانه في أمراض ثانية بتسبّب أشياء منهم، بس وجود أعراض وtests بتشير لمرض معين،الأشياء اللي فوق بتدعم التشخيص تبعنا وبتأكده

- CSF sample analysis (microscopic examination)

As we said before, there are 3 tubes:

• Chemistry tube:

o To measure glucose and protein

o Electrophoresis (to detect IgG band in multiple sclerosis)

يعني الchemistry tube مش بس للinfections، بقدر أعمل tests ثانية زي ال electrophoresis of the CSF ممكن يساعدنا بالdiagnosis of multiple sclerosis

• Hematology tube is for cell count and differential (RBCs, WBCs, etc)

للتذكير: الcell count حتى نعرف كم عنا RBCs, WBCs الخ..

والdifferential عشان نعرف إذا في WBCs شو هم الWBCs ؟ lymphocytes, neutrophils, eosinophils الخ..

- CSF Analysis

TABLE S–19 Findings of Cerebrospinal Fluid Analysis: Normal versus Infection

CLINICAL SITUATION	LEUKOCYTES/ MM³	% POLYMORPHONUCLEARS	GLUCOSE (% OF BLOOD)	PROTEIN (MG/D)	Appearance
Children and adults					
Normal	0-5	0	≥60	≤30	Clear
Viral infection	2-2000	≤50 mainly lymphocytes	≥60	30-80	Clear
Pyogenic bacterial infection	5-5000	≥60 mainly neutrophils	≤45[b]	>60	Cloudy
Tuberculosis and mycoses	5-2000	≤50 mainly lymphocytes	≤45	>60	Cloudy
Neonates					
Normal (term)	0-32	≤60	≥60	20-170 (90)	
Normal (preterm)	0-29	≤60	≥60	65-150 (115)	

[b]Usually very low.

اخدنا الجدول من قبل بمحاضرة الmeningitis بس هون رجعناله عشان نفهم أكثر أهمية الCSF analysis بالchemistry & hematology، الhematology بعدلنا الWBCs سواء كانوا polymorphnuclear cells or lymphocytes والchemistry بهمنا بالبروتين والغلوكوز

هسا مثلا الWBCs كانوا elevated (& mainly lymphocytes) والبروتين والغلوكوز كانوا كثير elevated، هاد دليل ممتاز انه viral infection

طيب شو الدليل للbacterial infection؟ اذا كانت الWBCs كثيير elevated، يعني احنا normally منلاقي 5 WBCs فاذا لقينا 5000 (يعني أكثر بألف مرة) هاد بعطيني دليل انه bacterial infection، واللي بدعمنا اكثر لما يكون في عنا elevated neutrophils (يعني تكون الneutrophils هي اكثر WBCs موجودين) + البروتين مرتفع، والغلوكوز منخفض كثير (الطبيعي يكون ٦٠ تقريبا فاذا كان ٤٥ او اقل معناها بكون منخفض)

برضو اللي بدعمنا أكثر ال microscopic observation <— الappearance بكون turbid (cloudy)

• Microbiology tube:

في كثير شغلات منقدر نعملها للCSF sample بالMicrosoft lab، في عنا أشياء بتوخد ٥ دقايق تقريبا وفي أشياء بتوخد ساعات، وفي زي ال CSF culture for bacteria بتوخد ٣ أيام، والfungi cultures بتحتاج أسبوعين لتنمو

• Direct wet mount preparation (detects the presence of Candida(yeast), Amoeba (which can be motile) and/or Cryptococcus species)

منوخد عينة الCSF، منحطها ع الslide ومنعمللها examination تحت الlight microscope

• Gram stain (gram positive or negative, Cocci or bacilli).

بهمنا نعرف انها gram (-) or (+) وهاد بفيدنا بالempirical treatment، الدكتور بعطي الantibiotic الصح وبكسب وقت لحد ما تطلع الfull results

• Acid fast stains (for detection of Mycobacterium tuberculosis).

• India ink stain (to detect the presence of Cryptococcus neoformans)

-From 2-4, they need 5-10 minutes for the results to be obtained.

• CSF culture and sensitivity for bacteria and fungi.

• CSF culture for viruses.

• CSF Serological tests

• Rapid antigen detection tests

• Molecular diagnosis (CSF PCR testing; to detect DNA/RNA)

-the last 5 methods may take longer time, we will talk about them in the next pages

➢ CSF Culture and sensitivity:

CSF culture can be done to detect viruses, bacteria, mycobacteria (gram + bacteria) and even fungus.

• CSF viral, bacterial (including mycobacterial) and fungal cultures remain the main stay in the diagnosis of infectious meningitis.

• Culture on routine media such as blood, chocolate and MacConkey agars.

• Culture on specific media such as Thayer-Martin agar, Lowenstein-Jensen medium for TB, SDA medium for fungal causes.

منستخدم الـvery specific media مثلا بحالة انه كان عنا اشتباه كبير انه المريض عنده TB meningitis فمنزرعها على media للـTB اللي هي الـLJ medium، لو شاكين بشكل كبير انه المريض عنه neisseria meningitidis منزرعها على Thayer-Martin agar، الخ..

• Sensitivity tests done to identify the appropriate antimicrobial therapy and need up to 72 hours for results to be obtained.

مشكلتها انها بتوخد ٧٢ ساعة، واخدنا انه الـmeningitis حالة طارئة فالدكتور بعطي empirical treatment بغطي الـmost common bacteria that can cause meningitis ومنشوف اذا البكتيريا كانت sensitive للدواء اللي اعطيناه عن طريق انه نتابع تحسن المريض ولو ما تحسن منغير الدواء حتى لو بعد ٣ أيام

• **CSF bacterial culture** requires up to 72 hours for final identification.

• **CSF fungal culture** needs up to 14 days for proper final identification.

• A recent study reported that **CSF mycobacterial culture** had a sensitivity of 22% and a specificity of 100% in diagnosis of tuberculosis meningitis.

يعني لو زرعنا culture للـmycobacteria وهاي الـculture طلعت positive فالـdiagnosis بكون ١٠٠٪ انه mycobacteria

بس مشكلة هاي الطريقة انها مش sensitive يعني احتمال انها تطلع positive results بس ٢٢٪ + البكتيريا بتوخد وقت طويل لتنمو

- CSF for viral culture:

في شغلات لازم نعرفها واللي هي انه مش أي لاب بقدر يعمل viral culture، لانه الفيروسات ما بتنمو على culture مش عايشة، هم بدهم خلايا عايشة تتقاسم، وتحت في أمثلة للـcultures اللي زي هيك، وعشان نخلي هاي الخلايا عايشة ويقدر الفيروس يتكاثر فيها وينمو لازم نضبط مستوى الاكسجين، الـCO2 الخ..

ثاني اشي، أغلب الفيروسات بتوخد وقت طويل لتنمو

• The virus for which culture remains most uniquely useful is HSV. Cell culture is also sometimes applied to the detection of CMV, VZV and the enteroviruses. It can also be used to detect measles, rubella, and mumps viruses. However, due to the long time and low sensitivity, CSF viral culture is often unable to provide the timely diagnosis required for optimum patient management and the rapid tests (PCR) are gradually replacing viral culture.

• Because no one cell culture type can support the growth of all medically relevant viruses, virology laboratories must maintain several different cell culture types. The

minimum requirements are a primary monkey kidney cell line, a human fibroblast line and a continuous human epithelial cell line such as HEp-2.

How to detect the presence of the virus in cell culture?

كل فيروس لما ينمو بالخلية بعمل effects بهاي الخلية منسميهم cytopathic effects، بتغير شكلها مثلا وبصير الها شكل معين تحت الlight microscope، لما نشوف الeffect بنعرف انه برجع للفيروس الفلاني، عشان هيك مش كل المختبرات بتعمل هاد الtest وبدها حد عنده خبرة

• Growth of viruses in cell culture is usually detected by visualizing morphological changes in the cells, known as cytopathic effect (CPE). The characteristics of the CPE are often sufficiently distinctive to allow the laboratory to be suspicious of which virus is responsible.

• Viral cultures usually take a long time to grow. The time required to detect CPE varies from 1– 2 days after inoculation for herpes simplex virus (HSV) to 1–3 weeks for CMV. Enteroviruses are the easiest viruses to culture with 75% sensitivity and changes appear between 3 to 8 days.

الHSV بده من يوم ليومين عشان هيك هو very effective بهاي الmethod، الenteroviruses بدهم ٣-٨ أيام بس الsensitivity تبعتهم مش كثير عالية

• Newer culture methods have been developed that detect viruses faster than ordinary culture methods such as shell vial culture.

- CSF serology

that we detect antibodies of the IgM or IgG type of certain organism <— serum نفس المبدأ تبع ال

مش كل الorganisms منقدر نلاقي الimmunoglobulins تبعتهم بالCSF

•Definitive serological diagnosis of CNS infections is established by detecting IgM antibodies or demonstrating at least a fourfold increase in neutralizing antibody titers between acute- and convalescent-phase CSF.

•In general, due to delay in antibody response after symptom onset, a negative antibody test cannot be used to rule out infections and retesting may be required.

الantibodies بختلف وقت ظهورها بالCSF، يعني ممكن تطلع بعد ٣ أيام من الinfections وفي antibodies بتطلع بعد أسبوع، فلو عملنا test وطلعت النتيجة negative هاد مش معناه انه ما في infection

•In most circumstances nucleic acid amplification tests have surpassed antibody-based detection as the test of choice.

الCSF serology زيه زي باقي الmethods اللي مش كثير هسا مستخدمة (زي الCSF viral culture)، الnucleic acid amplification/ rapid tests (molecular diagnosis & PCR)، هاي كلها صارت أحسن وأسرع وmore specific وصارت هي الtest of choice for most of the organisms

•These assays still have a valuable role in:

رح نذكر ٣ أمثلة مهم فيها انه نشوف الantibodies اللي بالCSF وهي الmethod of diagnosis

- CSF IgM is the most widely used test for West Nile virus (WNV) infections; antibody may appear as early as 3 days and persist for up to 3 months.

بتضل الantibodies موجودة بالCSF لـ٣ أشهر، عشان هيك الشخص ب تظهر معه أعراض الWNV اكيد رح نلاقي الIgM تبعته بالCSF

- Tests used for screening and diagnosis of neurosyphilis. Neurosyphilis can be confirmed by a positive CSF venereal disease research laboratory (VDRL) test.

الneurosyphilis منقدر نعمله الtest (VDRL) بحالتين: بالCSF + بالserum، لانه ممكن يطلع positive في ال٢

- Detection of antibodies to varicella zoster virus (VZV) IgG in CSF

هون احنا منحكي عن الIgG يعني الشخص صار عنده مناعة للVZV، عشان هيك في طرق ثانية أسرع وأفضل

➢ Rapid antigen detection

الtests اللي حكينا عندهم قبل كانوا للantibodies أما هاد الtest بلاحظ الantigens الموجودة على الorganism

• Among the antigen assays for CNS infections, Cryptococcal antigen is the most widely used. The test relies on detection of Cryptococcus capsular polysaccharide antigens in CSF.

• Detection of galactomannan (GM) antigen and (1,3)-β-D-glucan (BDG) in CSF can aid in the diagnosis of CNS aspergillosis or other invasive fungal infections

• For acute bacterial meningitis, a rapid antigen assay is available to detect Hemophilus influenza, pneumococcal and meningococcal capsular antigens.

➢ Molecular diagnosis of CNS infections

• Because of higher sensitivity and specificity, nucleic acid in vitro amplification based molecular techniques are now widely used.

• Molecular methods have dramatically improved the ability to diagnose CNS infections in a reasonable and effective time frame.

This method currently is becoming the method of choice of detecting most of the causes of CNS infections

• Divided into 2 types:

- Monoplexassays.
- Multiplexassays.

• Monoplex Assays:

Mono = it detects a single organism.

يعني لو عنا اشتباه كبير انه هاد المريض عنده HSV encephalitis، فإحنا منعمل monoplex <— just to detect HSV ، وحتى هاي الmethod صارت الtest of choice خاصة بالHSV encephalitis & meningitis

- One of the first molecular assays used successfully for CNS infection diagnosis was for detection of HSV in cerebrospinal fluid (CSF). PCR quickly became the test of choice when studies demonstrated that CSF PCR was equivalent to culture of brain tissue for diagnosis of HSV encephalitis and meningitis.

• Multiplex assays:

Multi = it searches for more than one causative agent

يعني بالkit الواحد منقدر نعمل test ل٦-٧ أنواع من البكتيريا ومرات لأكثر من هيك (مرات لبكتيريا لحالها ومرات لفيروسات لحالها ومرات لبكتيريا وفيروسات وحتى fungi مع بعض بkit واحد)

لو شاكين انه الشخص عنده bacterial meningitis بدل ما نعمل 8 tests يكونوا monoplex عشان أدوّر ع كل بكتيريا لحال، بعمل multiplex يدوّر عال٨ مع بعض وهيك منوفر وقت

- Several multiplex PCR assays have been developed to identify bacterial pathogens in CSF targeting the most common causes of meningitis: S. pneumoniae, N. meningitis, H. influenzae, L. monocytogenes, S. agalactiae, S. aureus, E. coli, and M. pneumoniae.
- Another multiplex PCR can simultaneously detect eight bacterial and viral pathogens in CSF including N. meningitis, S. pneumoniae, E. coli, S. aureus, L. monocytogenes, S. agalactiae, HSV-1/2, and VZV.
- The BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis panel is currently the only FDA cleared multiplex assay for the detection of six bacterial, seven viral (cytomegalovirus, enterovirus, HSV-1, HSV-2, human herpesvirus 6 (HHV-6), human parechovirus and VZV), and single fungal (Cryptococcus neoformans) target in CSF.

➢ Major CNS pathogens (they majorly cause meningitis)

• Group B Streptococcus • Streptococcus pneumonia

• Neisseria meningitidis • Hemophilus influenza

• Listeria monocytogenes • Staphylococcus aureus

• Gram negative rods (enterobacteriaceae; E. coli, Klebsiella spp., etc....)

• Mycobacterium tuberculosis • Fungal pathogens

رح نحكي عنهم بالصفحات الجاية

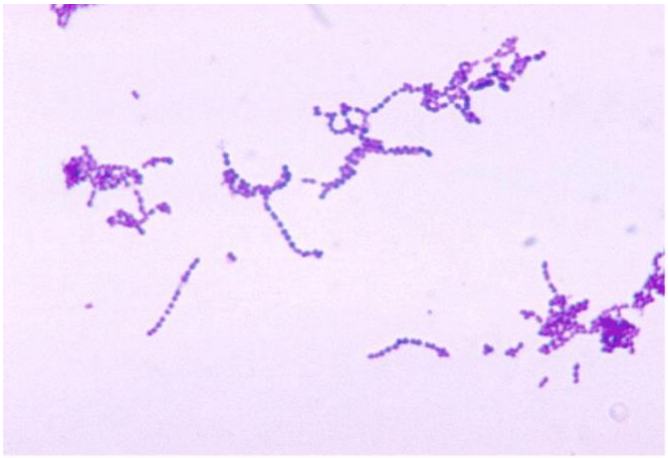
➢ Group B Streptococcus or S. agalactiae

• S. agalactiae causes meningitis and septicemia among newborns. Neonates become infected during delivery through maternal genital tracts colonized by GBS.

• Characteristics:

- Gram positive cocci in chains.
- Catalase negative
- Gray-white colonies on blood agar.
- Produce a narrow zone of beta hemolysis on blood agar. Sometimes we must remove the colony aside to see the beta hemolytic zone below it.
- Bacitracin resistant
- CAMP test positive

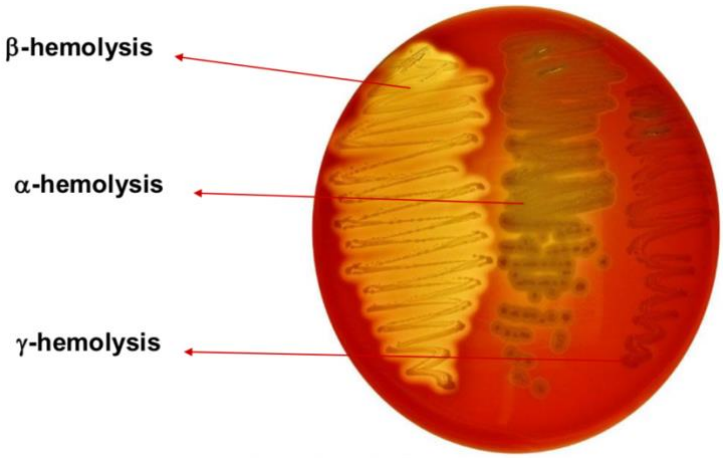
▪ S. agalactiae gram stain:



Streptococcus sp., Gram stain. (Credit: CDC, PHIL.)

Gram positive cocci in chains

- Types of hemolysis on blood agar (revision)



- β-hemolysis = complete hemolysis (بعطي لون شفاف)
- α-hemolysis = green colour
- γ-hemolysis = no hemolysis

(بكون في growth of colony بس ما بكون في hemolysis تحتها)

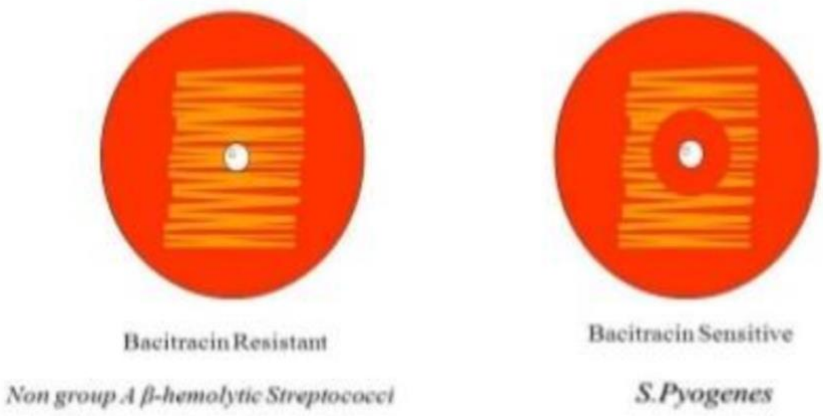
- S. agalactiae on blood agar:

بتكون الcolony لونها Gray-white وحواليها very narrow zone of hemolysis، هسا مرات الhemolysis ما بكون واضح زي هيك فمنضطر نشيل الcolony ع جنب ونشوف الβ-hemolysis تحتها

- Bacitracin test

• The traditional method of differentiating S. agalactiae from S. pyogenes is the use of bacitracin sensitivity test. A bacitracin (antibiotic) disk is used, and if no zone of inhibition is seen, the bacteria is considered resistant to Bacitracin, for example, S. agalactiae. If any zone of inhibition of growth is observed the test is considered positive; S. pyogenes.

الbacitracin هو نوع من الantibiotics، بكون group B streptococcus/ S.agalactiae <— resistant اله، إذا احنا شاكين انه هاي البكتيريا نوعها streptococcus بس مش عارفين هي جروب A ولا B فمنحطها
بbacitracin test، لما تضلها resistant للbacitracin disc وما تعمل zone of inhibition زي الصورة اللي ع الشمال، منتأكد انها Non group A β-hemolytic strep. أما إذا صار في zone of inhibition حوالين الbacitracin disc هاد معناه انه هاي البكتيريا bacitracin sensitive وبالتالي هاي البكتيريا ب.group A strep



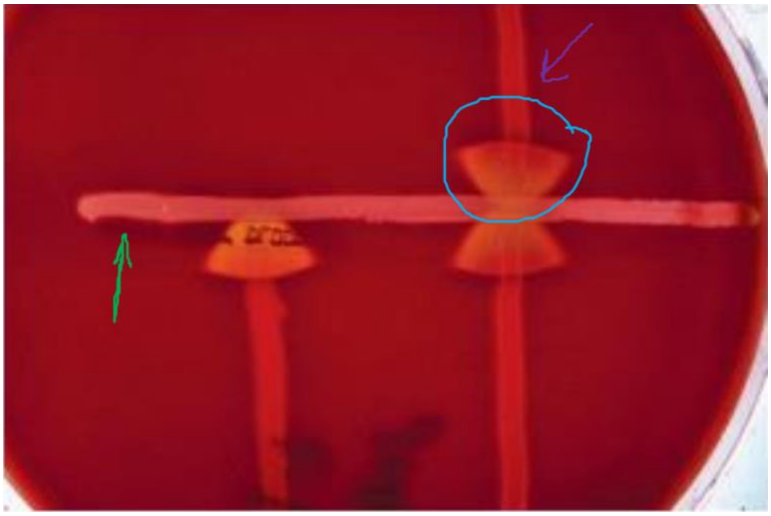
- CAMP test

• The CAMP factor is a diffusible extracellular protein that acts synergistically with staphylococcal- lysin to cause enhanced lysis of red blood cells.

• A blood agar plate is inoculated by making perpendicular streaks of a lysin producing strain of Staphylococcus aureus and the organism to be tested.

• An arrowhead-shaped zone of enhanced hemolysis in the area into which both the lysin and the CAMP factor have diffused represents a positive test result. S. agalactiae gives a positive test result.

هسا احنا عنا blood agar، أول اشي منحط horizontal streak of S.aureus وهاي الs.aureus بتعمل مادة اسمها lysin بتعمل lysis of RBCs وبتعمل zone of hemolysis.. هسا احنا منحتاج انه نعرف اذا الorganism اللي عنا هو group B strep. ولا لا، فاللي بصير انه احنا منحط الgroup B strep. بالنسبة لs.aureus، فاللي بصير انه group B S.agalactiae بتنتج اللي منسميه CAMP factor وهاد الfactor بشتغل synergistically مع الlysin اللي انتجته الS.aureus وبتعمل enhance of hemolysis وبنتجوا ال arrow head shape hemolysis، فهاد الenhancement of hemolysis بكون positive CAMP test.



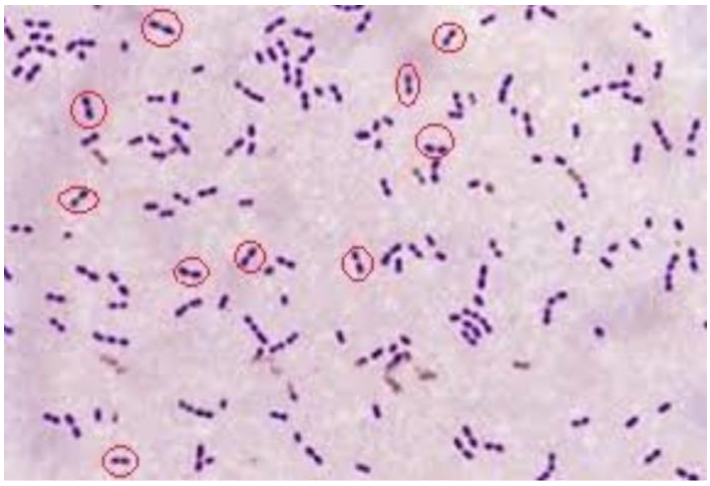
- Streptococcus pneumonia

• Streptococcus pneumonia is also a major cause of meningitis and ear and sinus infections.

• Characteristics:

- Gram-positive cocci arranged in pairs or diplococci
- Catalase negative.
- Colonies are usually transparent, slightly mucoid, or flattened.
- Alpha-hemolytic on blood agar.
- Optochin susceptible.

- S. pneumonia gram stain:



Gram-positive cocci arranged in pairs or diplococci

هي ما بتكون دائرية بالكامل، بتكون شكلها زي ورقة الشجرة (lancet shape)

- S. pneumonia on blood agar:

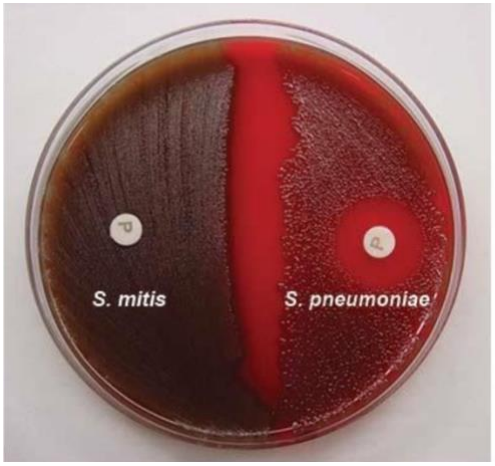
Alpha-hemolytic (green in color)

- Optochin sensitivity test:

It's similar to bacitracin test.

• Optochin is a chemical that kills S. pneumonia but does not kill other alpha-hemolytic streptococci. In this test, an Optochin impregnated paper disk is placed onto the surface of a blood agar plate that has previously been inoculated with the isolate.

• If the zone of no growth is more than or equal to 16 mm (1.6 cm) then the organism can be identified as S. pneumonia. If the isolate produces a smaller zone of no growth, then the isolate is not S. pneumonia.



Left Side

S. mitis

Resistant to optochin

Right Side

S. pneumoniae

Susceptible to optochin

- Neisseria meningitidis

• The usual manifestations of N. meningitidis disease are meningococcemia (N. meningitidis in the bloodstream), petechiae (tiny red spots on the skin), and meningitis.

• Characteristics:

◦ A rapid presumptive diagnosis of meningococcal meningitis can be made when leukocytes (WBCs) and Gram-negative diplococci are observed in Gram-stained smears obtained from CSF specimens.

WBCs & Gram-negative diplococci :CSFمنلاقي بال

◦ N. meningitidis colonies are gray, convex, and glistening, with a smooth, moist entire edge (يعني دائري كامل) .

◦ N. meningitidis will oxidize glucose and maltose.

◦ N. meningitidis is oxidase positive.

◦ N. meningitidis is catalase positive.

• Neisseria species are **capnophilic** (need a moist 5-7% CO2 atmosphere) at 37 degrees Celsius.

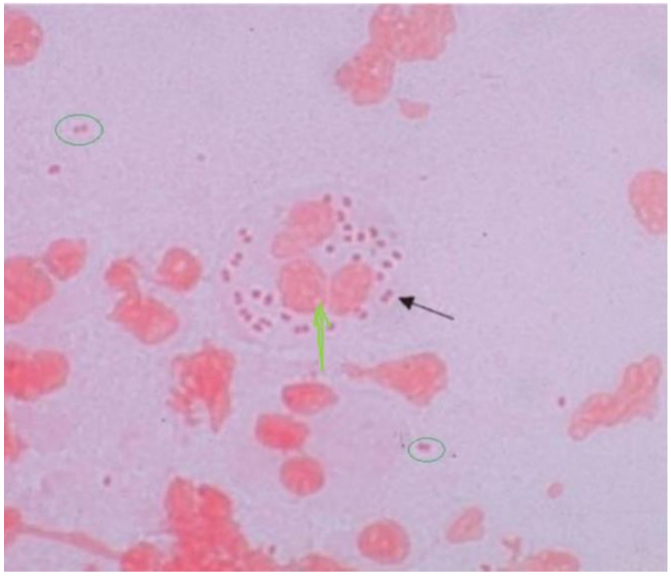
We need special incubator for them to grow.

• Neisseria meningitidis can grow on:

- Blood agar
- Chocolate agar
- Selective media such as Thayer Martin agar, Martin Lewis agar, etc.

Neisseria هاد المريض عنده انه high suspicion عنا كان اذا الا عليها منزرع ما selective mediaال هاي
meningitidis وانها causative agentال للmeningitis

- N. meningitidis gram stain



اللي عند السهم الأخضر عبارة عن الnuclei تبعت الneutrophil —> WBC

واللي عند السهم الأسود هم الdiplococci والstain تبعتهم gram (-)

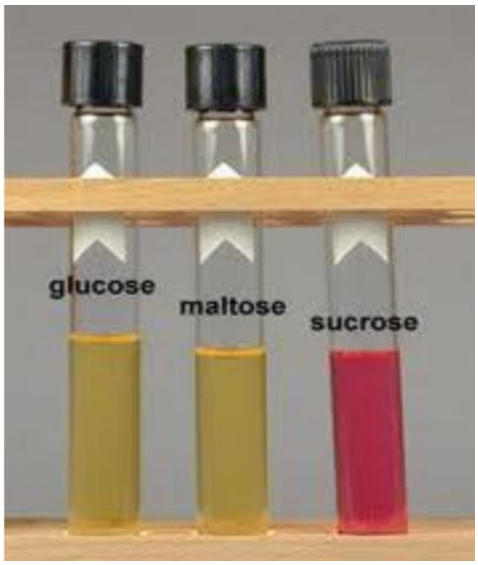
وبالتالي وجود الWBCs مع الdiplococci بعطيني rapid presumptive diagnosis انه المريض عنده N. meningitidis وهي الcausative agent of meningitis

- N. meningitidis colonies

الcolony تبعتها على الblood agar بتكون دائرية وglistening (بتلمع)، ولونها gray وconvex (يعني بتكون مرتفعة شوي عن الsurface of the agar) + ما بتعمل hemolysis

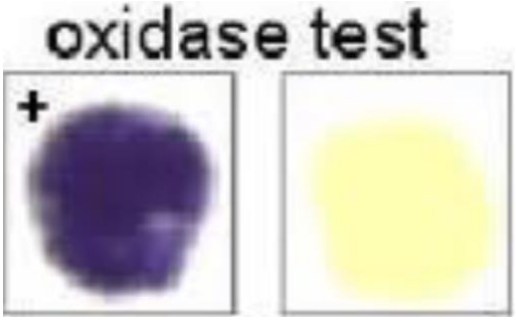
- N. meningitidis ferments glucose and maltose, but it doesn't ferment sucrose

الfermentation بخلي المادة لونها yellow



- Oxidase test:

Positive.. If we put the colony on the oxidase agent, the colony's color will turn from yellow into dark purple.



➢ Hemophilus influenzae

• H. influenzae is one of the three major causes of bacterial meningitis (S. pneumonia and N. meningitides).

الH. influenzae هي ثالث سبب شائع للإصابة بالbacterial meningitis بعد S. pneumonia and N. meningitides

• Characteristics:

o Gram negative coccobacilli

o **On chocolate agar:** H. influenzae colonies are grayish, semiopaque, smooth, and flat.

الH. Influenzae ما بتنمو على الblood agar بنفسها فغالبا هي بتنمو على الchocolate agar

o Oxidase and catalase positive

• In vitro growth of H. influenzae requires the culture medium to contain both:

1. **Hemin**, referred to as X factor

2. **Nicotinamide adenine dinucleotide** or NAD referred to as V factor.

الH. Influenzae بتحتاج لfactors يساعدوها عشان تنمو، بالblood agar هاي الfactors موجودة داخل الRBCs ولكن الRBCs هاي بتكون intact فالfactors بتضل جواهم والبكتيريا ما بتقدر تستخدمهم وتنمو.. عشان هيك الH. Influenzae ما بتقدر تنمو على الnormal sheep blood agar

• Both X and V factors are present inside sheep red blood cells but H. influenzae will not grow on normal sheep blood agar. However, it will grow on horse and rabbit blood agar and on chocolate agar; because X and V factors are both present in this media.

طيب لنفرض انه ما عنا media غير الsheep blood agar، كيف بدي أخلي هاي البكتيريا تنمو عليها؟

أول اشي بجيب الblood agar وبزرع عليها الH. influenzae أو الCSF sample اللي شاكين انه فيها H. influenzae، بعدها منجيب S.aureus strain (واحنا منعرف انها بتعمل hemolysis لانها بتنتج الhemolysins)، فبعد ما نزرع الsample of CSF بنيجي بنعمل streak (خط) بقطع اللي زرعناه وبنتركه ينزرع طول الليل وكونه فيها hemolysins رح يعملوا hemolysis للnearby RBCs، فالRBCs اللي حوالين الstreak رح يفرزوا الfactors، وبالتالي اذا في H. influenzae بالsample رح تنمو، بس ما رح تنمو على كل الblood agar، رح تنمو بالarea اللي صار فيها hemolysis، عشان هيك هاي الH. influenzae بتكون محيطة بالS.aureus وهاي الظاهرة منسميها satelliting <— يعني كيف الsatellite بكون محوط الأرض بس وما بطلع من الغلاف الجوي، نفس المبدأ.. الH. influenzae ما بتنمو بكل الplate، بس بتكون محوطة الstreak اللي عامل hemolysis

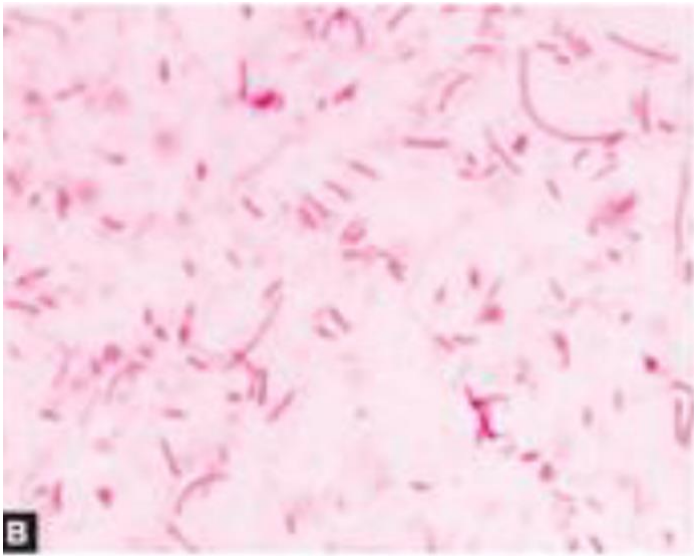
• Sheep blood agar can be used to grow H. influenzae by the following method:

oThe inoculated sheep blood agar plate can be cross-streaked with a Staphylococcus strain.

After lysing the sheep RBCs, V and X factors will be released into the medium.

o H. influenzae will grow in the immediate vicinity of the Staphylococcus strain, a phenomenon called satelliting.

- H. influenza gram stain

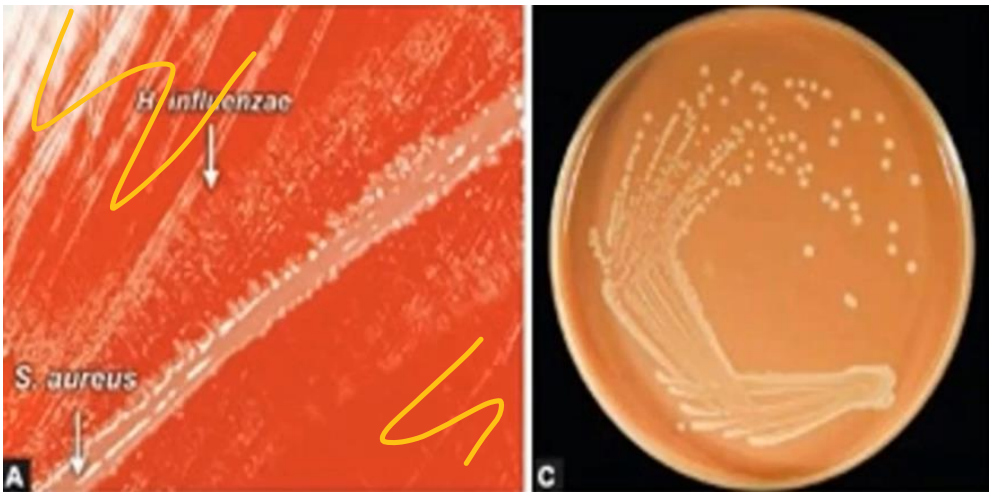


Gram (-), coccobacilli

- H. influenza colony morphology

على اليمين في الchocolate agar والH. influenzae نامية عليه —> بكون لونها gray، بتكون flat، oxidase positive, catalase positive, no hemolysis

على اليسار في خط للS.aureus، والH. influenzae نامية جنب الخط، بس بالمناطق البعيدة (عند الخط الأصفر) ما في نمو الها



- Listeria monocytogenes

• L. monocytogenes is one of the major causes of neonatal meningitis.

• Characteristics:

o Short, nonbranching Gram-positive bacilli on gram stain

o Observation of tumbling motility in a wet mount (https://www.youtube.com/watch?v=bV_Wd7JCo6A)

Tumbling = يعني كإنها بتلاخم، بتتحرك كثير

o A narrow zone of beta-hemolysis on blood agar, resembles growth of Streptococci.

هي بتشتبه الstreptococci بهاي النقطة، بس منفدر نميزها عنها عن طريق الmotility مثلا

o Umbrella-shaped growth in semisolid agar medium. <— في عنا طرق ثانية لنشوف حركتها

o Catalase positive.

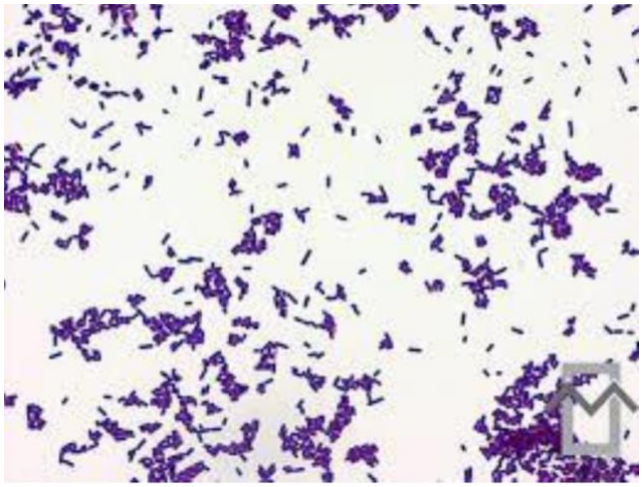
وهاد فرق ثاني عن الstreptococci

o Optimum growth at 30-37 degrees but can grow at 4 degrees (cold enrichment).

الL. monocytogenes من البكتيريا القليلة اللي ما بتموت تحت درجات الحرارة القليلة، وبتعيش تحت درجة حرارة ٤

- L. monocytogenes gram stain:

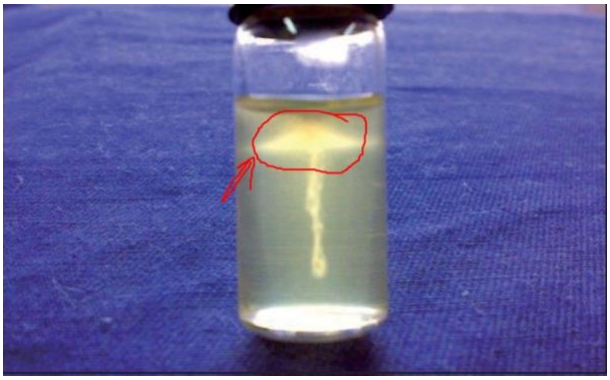
Gram (+) stain



- L. monocytogenes on blood agar:

زي ما هو واضح بالصورة انه الgrowth تبعها كثير smooth، وكثير بخربطوا بينها وبين الstreptococci لانه برضو الgrowth تبعها ناعم + انه ال٢ عندهم narrow zone of beta-hemolysis، هسا الفرق بينهم بال gram stain انه هاي bacilli اما هديك cocci، الlisteria بتكون catalase (+) أما الstreptococci بتكون catalase (-)

- Umbrella shaped motility (on semisolid media)



- Staphylococcus aureus

• It is also capable of causing meningitis.

• Characteristics:

o Gram positive cocci in clusters (زي عناقيد العنب)

o Colonies are large smooth, slightly raised, translucent, and pigmented. They may be off-white, gray, or yellow.

S.aureus هاد مش معناه انها مش yellow بس لو ما كانت ،yellow أكثر من أي لون ثاني بكونوا

o Colonies are often surrounded by a wide zone of beta-hemolysis.

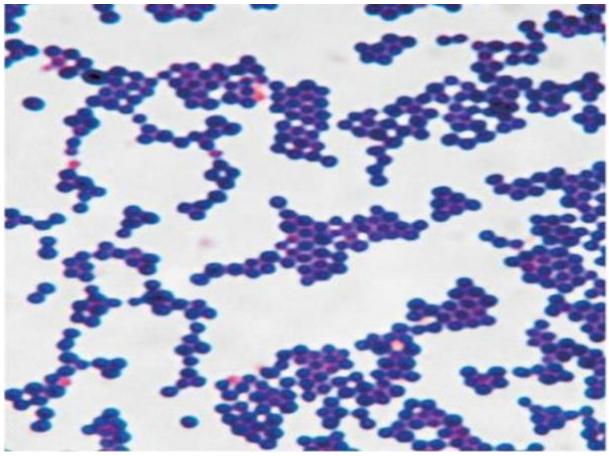
o Catalase positive

o Coagulase positive

o Mannitol fermenters

- S. aureus gram stain

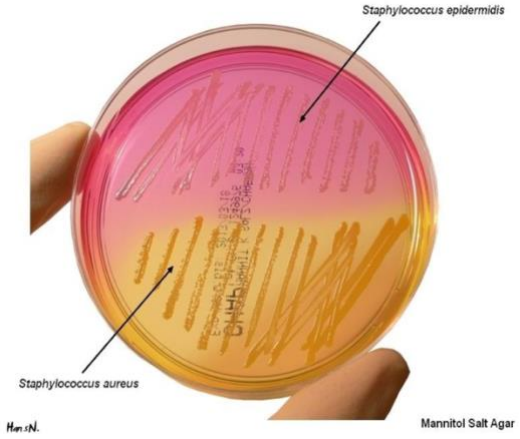
Gram (+), in clusters



- S. aureus colony morphology:

حواليهم wide zone of beta-hemolysis، بكونوا large، وهون لونها gold/yellow، واضحة وconvex

- S. aureus mannitol salt agar



منقدر نستخدمها حتى نميز الS.aureus من ال.staph الثانية، لانها الوحيدة اللي بتقدر تعمل fermentation للmannitol

-زي ما احنا شايفين بالصورة اللون تبع الagar زهري، ولما حطينا الS.aureus بالagar عملت fermentation للmannitol وتغير الجزء اللي فيه الS.aureus للأصفر

➢ Enterobacteriaceae

• Some of the enterobacteriaceae can cause meningitis. Example: E. coli, Klebsiella pneumonia and Proteus species.

• Characteristics:

o Gram negative bacilli on gram stain

o Can grow on blood, chocolate and MacConkey agars each with a specific colony morphology

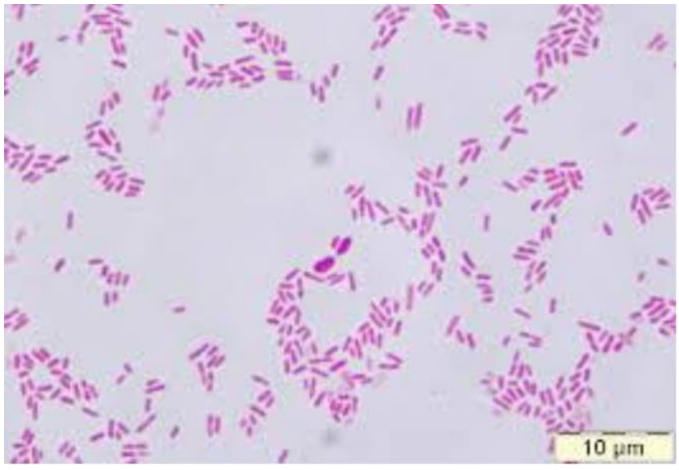
o Catalase positive

o Oxidase negative

o E. coli and Klebsiella species are lactose fermenters that turn MacConkey agar into dark pink color.

o All are motile except for Klebsiella species.

- Enterobacteriaceae gram stain:



صعب انه نميز أي وحدة من ال species هي عن طريق الgram stain، بس لما نشوف انه النتيجة طلعت gram (-) + bacilli بصير عنا اشتباه انها enterobacteriaceae وبعدها منعمل further tests عشان نعرف الexact species

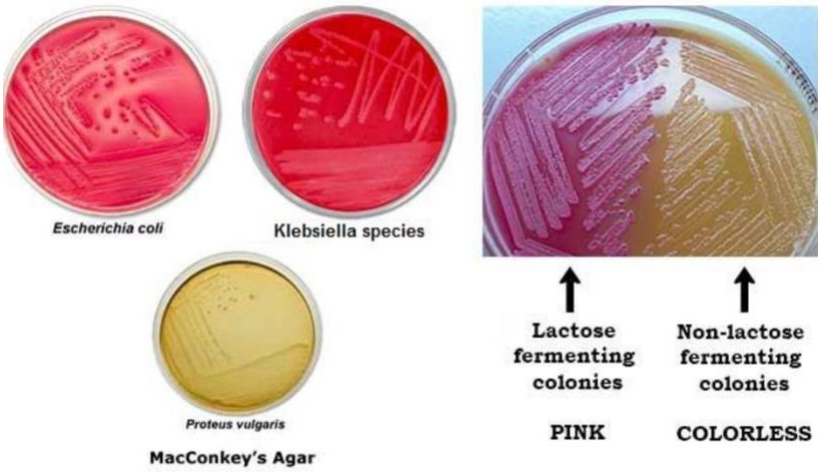
- MacConkey Agar

هي وحدة من الطرق اللي بتساعدنا انه نميز الenterobacteriaceae species عن بعض، عن طريق انه بساعدنا نعرف إذا البكتيريا lactose fermenter أو لا

The 2 important lactose fermenters of enterobacteriaceae are: E.coli + klebsiella species

When we implant them on the MacConkey agar they turn its color into dark pink (or even fuchsia color), and this is an indication that they are lactose fermenters.

بس عنا الproteus مثلا بتخلي لون الagar زي ما هي (colorless)



- Biochemical tests

• Multiple biochemical tests must be done to differentiate the exact organism causing meningitis.

Gram reaction	Urease	Oxidase	Indole	Citrate	Lactose	Motility	Isolates
GNB	+	-	-	+	+	-	*Klebsiella* spp
GNB	+	-	V	+	-	+	*Proteus*
GNB	-	-	+	-	+	+	*Escherichia coli*

GNB= Gram negative bacilli; + = positive; - = negative

الbiochemical tests هدول كلهم مجموعة من الurease test, oxidase, indole, lactose, motility الخ.. بميزوا الorganisms عن بعض

لو مثلا عملنا test لorganism احنا شاكين انه هو enterobacteriaceae، اذا كل الorganisms كانت motile ووحدة بس non-motile منعرف انه هاي الnon-motile هي الklebsiella

مثال ثاني: الE.coli بكون عادة urease negative & citrate negative وهاد بميزها عن البكتيريا الثانية، في المقابل الklebsiella هي urease positive & citrate positive، الproteus هي urease positive & citrate positive بس اللي بميزها انها lactose non-fermenter، وهدول ال٣ كلهم oxidase negative

A. Positive: Proteus spp.
B. Positive: Klebsiella spp.
C. Negative: Escherichia coli

Urease test
(Christensens Urea agar)

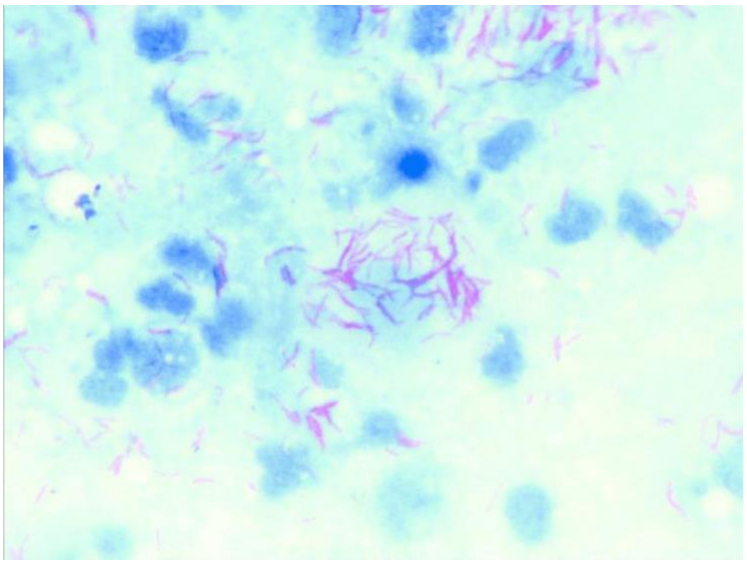
بهاي الصورة ببين عنا الurease test، منشوف اذا البكتيريا عندها الurease enzyme اللي بتكسر فيه الureaل other compounds

فإذا كان positive (عنده urease) بتحول ال pH indicator من الyellow للpink

- Tuberculous meningitis

اسم المرض tuberculous meningitis يعني المرض صار بسبب ال Mycobacterium tuberculosis، واخدنا انها ما بتنشاف بالgram stain وبس منشوفها بالAcid fast stain عشان الwaxy cell wall تبعها اللي فيه mycolic acid

- Acid fast stain (positive for TB)



منعرف انها positive للacid fast stain من اللوم الزهري، ومنميزها عن الgram stain انه الخلفية بكون لونها أزرق

- Lowenstein-Jensen medium for TB culture

ال Mycobacterium tuberculosis ما بتقدر تنمو بـnormal media ، بتحتاج selective media حتى تنمو، واسم الspecific media هاي Lowenstein-Jensen medium.. ال Mycobacterium tuberculosis بنمو على شكل yellow colonies على الmedia اللي لونها أخضر زي اللي بالصورة

- Fungal tests

How to diagnose fungal infections?

الfungi بتنمو على الculture وعادة بتوخد أسبوعين لتنمو..

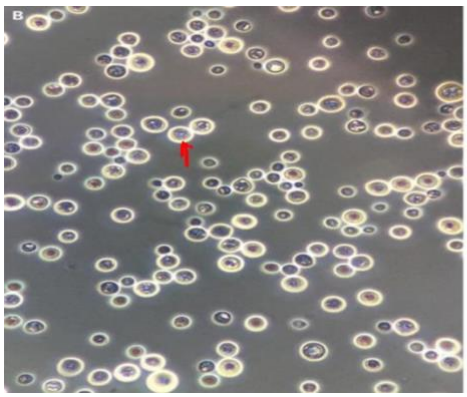
The most commonly used specific media for fungal cultures is Sabouraud Dextrose agar (SDA).

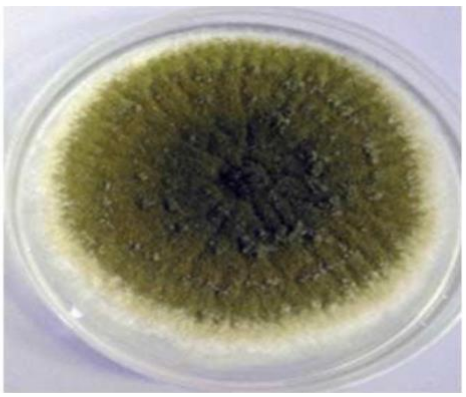
Different fungi have different colony types on SDA (each fungus has specific growth on SDA). In addition, under the microscope each fungus has certain characteristics.

وعنا الindia ink stain بتساعدنا بالdiagnosis of C.neoformans

• Fungal cultures are done specific media for example Sabouraud Dextrose agar (SDA).

• India ink test for detection of C. neoformans.





الخلفية بتكون dark gray/ black والC.neoformans لانها عبارة عن yeast surrounded by a polysaccharide capsule هاي الcapsule بتعمل هالة (لونها أبيض، عند السهم) بتحيط بالfungus، بتميز الC.neoformans عن غيرها

The end..

" لَا تَدْرِي لَعَلَّ اللَّهَ يُحْدِثُ بَعْدَ ذَلِكَ أَمْرًا "