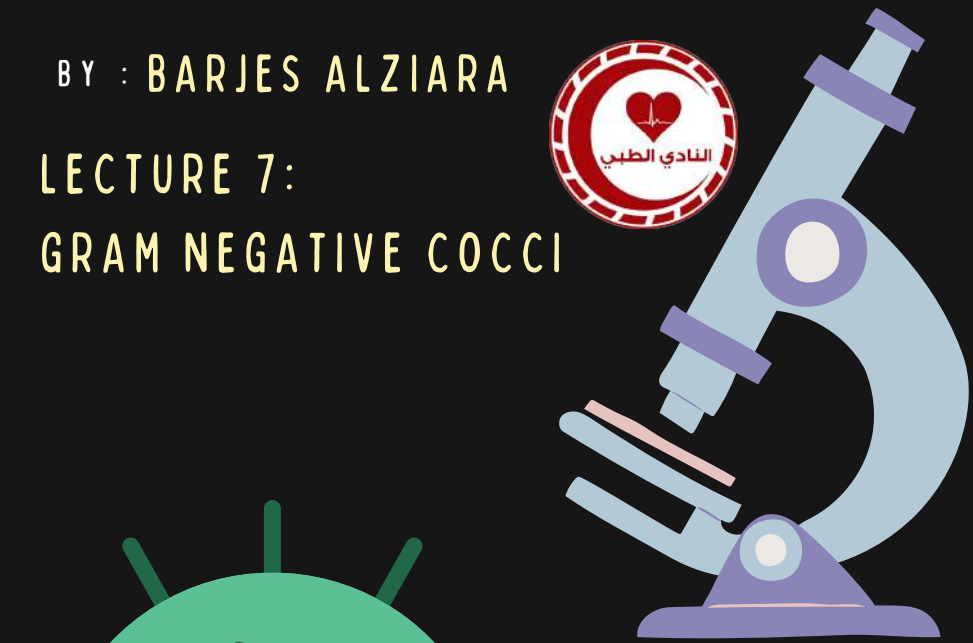
BY : BARJES ALZIARA

LECTURE 7:
GRAM NEGATIVE COCCI



GENERAL MICROBIOLOGY

بتمنى الكل يقرأ لاخر حرف
يجماعة انا وضحت بالمحاضرة الماضية ع اول سلايد انا كيف ماشي بترقيم الفايلات مش ترقيم المحاضرات

نقطة انتبهتلها جدا جدا جدا مهم الكل يتبع عليها
انهمرات الدكتور بعطي نص ملف
فانا بنزل نصه و بس يكمله بنزل التكمله و بدمجها معه
و بحدث كل اللينكات

ممكن ناس يكونوا نزلوا الجزء الأول من المحاضرة بس
فيا جماعة حاولوا دايما اعرفوا بالزبط شو المحاضرة اللي بتدرسوها و لوين بتخلص و هل نزلتوها كاملة ولا لا

اي حدا بدرس من تفاريغي بس بدي اطلب منك ترجع للبوست المثبت ع السريع تتاكد انك منزل المحاضرات كاملين

ان شاء الله راح اوضح بالمحاضرات الجاي اذا انتهيت او لا ع اخر صفحة

Introduction

بعد ما حكينا المحاضرة الماضية عن ال gram positive و عن خصائصها و الامراض اللي بتعملها
اجا دور الgram negative bacteria

Gram –ve cocci

راح نحكي بالبداية عن ال cocci

- **Neisseria gonorrhoeae**
- **Neisseria meningitidis**
- **Moraxella catarrhalis**

اشهر عائلة للـ gram negative عائلة ال neisseria و الها 11 species
احنا راح نحكي بالمحاضرة عن اثنين
N.gonorrhoeae
N.meningitidis

- **Other Neisseria species (non-pathogenic) N. cineria, N. lactamica, N. polysaccharea, N. subflava, N. sicca, N. mucosa, N. flavescens**

بالنسبة للـ Moraxella catarrhalis كانت تابعة الهم بس ما راح نحكي عنها

NEISSERIA GONORRHOEAE(GONOCOCCUS)

General Characteristics and Properties

- **Neisseriae are gram-negative diplococci (Bean or kidney shaped).**

اول خاصية الها انها diplococci يعني انه شكلها شبه حبة الفاصوليا
اول شبه الكلية و بتكون دايما عشكل ازواج

- **facultative anaerobe**
- **Non motile, non spor forming**
- **Incbation period 1-14 days**

فترة الحضانة تاعتها من يوم ل 14 يوم
يعني اعراض البكتيريا بتطلع عليك اما باليوم الاول اول الثاني لحد ال 14

- **Oxidase positive (most catalase positive)**

فيها انزيمين ال catalase و ال oxidase

- **Humans are only reservoir, not part of normal flora**

هي بتعبر الانسان بس كائن مشان تستعمره عمره ما اعتبرناها normal flora

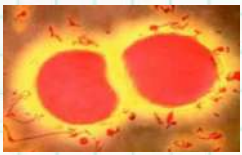
- **N. gonorrhoeae infects columnar or cubodial epithelium**

بتعمل infection للخلايا ا ال cubodial و ال columnar

- **It attaches via pili and penetrates within 1-2 days**

احد اهم ميزات هاي البكتيريا انها عندها pilli اللي بساعدها في attachment

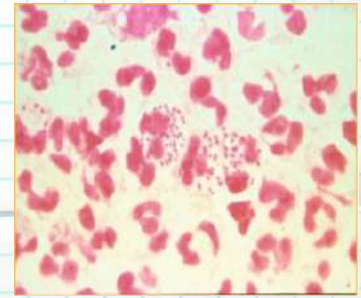
- **There is a neutrophilic response which creates a purulent discharge**



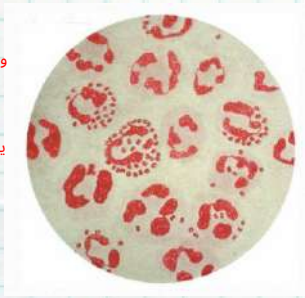
لما تفوت الجسم بصير في استجابة من ال neutrophils اللي بتسبب تكون ال pus
ال pus عبارة عن مجموعة خلايا من ال tissue و خلا neurophilis و بتتراكم اللي اذا تسرب ال pus بعمللنا purulent discharge

Gonorrhea: Gram Stain of Urethral Discharge

لنفرض اجا عليك مريض معه مرض ال gonorrehea اللي بتميز بخروج افرازات من الاعضاء التناسلية
انت اخذت عينة من هاي الافرازات و حطيتها تحت المجهر شو راح تشوف



راح تشوف خلايا كبيرة ال neurophilis
و جواتها في نقط صغيرة اللي هي بكتيريا dipolcocci
و برضو في بكتيريا بتكون برا الخلايا المناعية
يعني عنا بكتيريا extracellular برا خلايا ال neurophilis
و intracellular جوا خلايا ال neurophilis

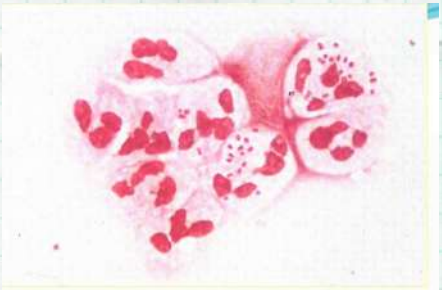


On Gram stained slides, in gonococcal infection, the following are seen:

Polymorphs.

Gram-negative kidney-shaped extracellular and intracellular diplococci

(ICDC).



Gram stain of urethral discharge showing gram negative, intracellular diplococci.

من ناحية clinically
ال N.gonorrhoeae
و ال N.meningitidis
كل وحدة بتعمل امراض مختلفة

لكن بشبهوا بعض كثير من ناحية الخصائص تاعتهم

بس برضو في اختلافات بالخصائص اللي راح نحكي عنهم هسه

- **Gonococci are very sensitive to heating or drying. Cultures must be plated rapidly.**
- **Causes disease only in humans.**
- **Killed by drying that's why transmitted sexually.**
- **Non-sexual transimission is extremely rare**

ال gonococci حساسة لل heat و drying
مشان هيك بدها بيئة مناسبةمن تنمو و تنتقل
اما ال N.meningitidis اقوى
لانها حساسة ما بتقدر تنتقل الا مباشرة
مشان هيك غالبا تنتقل sexually

برضو العينة لازم احافظ عليها
لانه زي ما قلنا البكتيريا هاي حساسة
وبتموت بسرعة بالظروف المش مناسبة

قبل ما نكمل خلينا نحكي شوي عن ال clinical presentation
بما انه هاي البكتيريا عبارة بتنتقل جنسيا غالبا بيصير ال infection بال genital organs
شو الاعراض اللي بتصير له
frequency و urgency يعني بزيد عنده التبول بشكل متكرر
dysuria يعني بكون في الم مع التبول
و هاي نفس اعراض ال UTI او التهاب المسالك البولية

هسه اذا حدا حكالك كل الاعراض هاي فغالبا هو معه UTI
بس
اذا قلك معي discharge سيلان
هون بنكون دخلنا بموضوع الامراض المنقولة جنسيا

LABORATORY DIAGNOSIS

SPECIMENS COLLECTED:

بال male ممكن توخذ exudate اللي نفسه الpus discharge
او بتوخذ scraping يعني بتوخذ عينة من النسيج

A) In men:

- **Urethral exudate**
- **Urethral scraping(loop r special swab)**

B) In women:

اول خطوة من خطوات التشخيص هي انك توخذ عينة من المريض
و بنوخذها من مكان ال infection
اللي هو زي ما حكينا بكون غالبا بال sex organ او الاعضاء اللي حولها
بال male بوخذ من urethra
اما ال female بنوخذ من ال cervix

- **Cervical swabs**

بال female بسحب عينة من ال cervix عن طريق speculum

Specimen collection and transportation

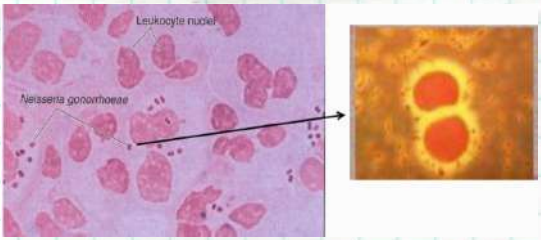
- **Should be processed immediately (no more than 6 hours)**
- **Do not expose to high temperature or dry conditions**
- **Transport in media with increased CO2 using special packaged system that contain CO2 generation system**

بما انها حساسة للظروف فلازم ندرسها بسرعة قبل ما تموت العينة و لازم ما نعرضها للالحاراة العالية و للجفاف لازم نحفظ العينة عند درجة حرارة بين ٣٥ و ٣٦ و برضو نوفر شوي CO2 زيادة (اذا متذكرين كنا نعتبرها اشي اسمه Capnophiles بمحاضرة 3
و اذا مش متذكر هذا الحكي ارجع راجع الحداول بمحاضرة 3)

1. GRAM STAIN

- **Gram–ve diploccoci inside polymorphonuclear leukocytes**
- **Gram stain: 95% specific and sensitive in men, 50% - 70% in women**

اذا شفت هاي الصورة بال male
95 % معه هاي البكتيريا
اما الfemale
مش اكيد بتكون هاي البكيريا هي السبب فلازم نعمل كمان
خطوة مشان تنتاكد



بنميز هذا النوع عن غيره من البكتيريا بعد ما نعمل GRAM staining بوجود البكتيريا داخل الخلايا وخارجها بالإضافة لوجود كريات الدم البيضاء الي بنقدر نميزها من شكل النواة kidney shape

Lab diagnosis:

- **In the male, the finding of numerous neutrophils containing gram negative diplococci in a smear of urethral exudate provides a diagnosis of gonococcal infection.**

- **Diagnostic if gram negative diplococci are seen within polymorphonuclear leukocytes (95% sensitivity)**

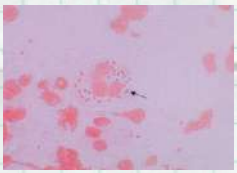
- **In the female a positive culture is also needed.**

زي ما قلنا يعتبر GRAM staining كافي لتشخيص وجود هذا النوع من البكتيريا عند الذكور اما عند النساء بنكمل وبنعمل culture عشان نتأكد

Culture:

- **N. gonorrhoeae grows best under aerobic conditions, and most strains require CO2 also.**

احسن culture ممكن تنمو فيها هاي البكتيريا االي بكون فيها o2 و برضو فيها CO2



يعتبر الmedia المكان الي بتحصل البكتيريا من خلاله على الغذاء وأي شيء آخر بمكنها من البقاء على قيد الحياة والتكاثر

2. CULTURE

بالمحاضرة الماضية حكينا انه ال media ممكن تكون selective و ممكن تكون nonselective
هذول ال media كلهم selective لانواع ال neisseris
يعني ولا نوع اخر بنمو يهاي البيئة غيرها

Media:

الدكتور ما حكا هون كثير بس كتبت شغلات المهم بس تفهموها مشان الاسماء هون غريبة

- **Thayer-Marten Media (TM): Enriched chocolate agar with antimicrobial colistin (to inhibit G- bacili) nystatin (to inhibit yeast) and vancomycin (to inhibt G+ve bacteria)**

اول media عنا هي ال TM اللي بتتكون من chocolate agar و اللي هو زي صحن الدم اللي حكينا عنه بالمحاضرة الماضية بس الفرق انه بكسرنا ال RBCs قطلع لونه بني مشان هيك سموه هيك ثاني اشي عندك مواد antimicrobal لل G- bacili و yeast و G+bacteria مشان هيك هاي البيئة بس بنمو فيها الG- cocci بالذات ال gonococcus

- **Modified Thayer-Marten Media (MTM): as above plus trimethoprim (to inhibit proteus)**

ثاني media هي ال MTM و اللي نفس اللي فوق بس ضفنا trimethoprim اللي بثبط نمو ال proteus

- **Martin-Lewis medium (ML): same as above except that anisomysin is substituted for nystatin and vancomycin concentration is increased**

برضو نفس اللي فوق بس ضفنا مادة اسمها anismysin لل nystatin و زدنا تركيز ال vancomycin

Incubation conditions:

لأنها تعتبر facultative anaerobs

They are aerobic but may grow anaerobically also.

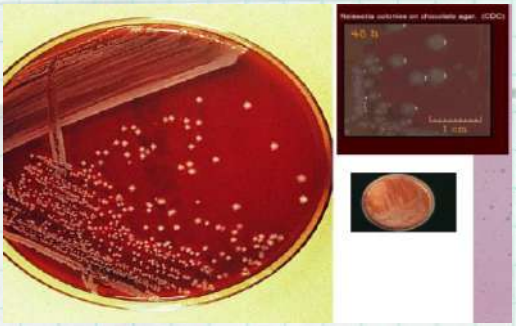
- **The optimum temperature for growth is 35- 36°C & optimum pH is 7.2-7.6.**
- **It is essential to provide 5-10% CO2**

ضروري نوفر 5-10% من Co2

Colonial appearance:

بعد ما احط العينة على ال media و بتركها 24hrs ل 48hrs
و راح يطلع عنا colony يعني عنا ملايين من ال bacterial cells

- **Small, grayish white, convex, translucent, shiny, with smooth or irregular margins**



3. BIOCHEMICAL TESTS

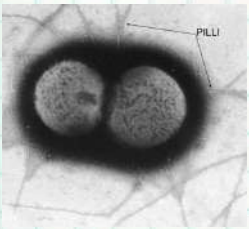
هسه بدنا نتاكد عن طريق ال biochemical test
بنعمل oxiadtion اذا طلعت positive ممكن تكون gonococcus
لانه حكينا من خصائصها وجود انزيم الoxidase
اذا negative ما بتكون هي

بنعمل glucose fermentaion test اذا positive برضو ممكن gonococcus
ال maltose + ال lactose لازم دايما يكون و negative

nitrite reduction رضو لازم يكون negative

- **Oxidase positive**
- **Glucose fermentation positive (while maltose and lactose fermentation is negative)**
- **Nitrite reduction negative**

هون بدنا نحكي عن شو اللي بيصير تعمللنا infection



Pathogenecity:

The virulence factors are.

1.**Pili. Most important virulence factors (initial attachment).**

اول اشي انه هي عندها pili اللي بتعمل attachment للكائن المصاب و هذا اكثر عامل
قوة لهاي البكتيريا

- **Piliated gonococci are usually virulent, whereas non piliated strains are avirulent.**

2.Two virulence factors in the cell wall

ثاني عامل قوة الها بيكون على ال cell wall

a. Lipooligosaccharide (LOS) (a modified form of endotoxin).

Endotoxin of gonococci is weaker than that of meningococci.

عندها على نهاية ال cell wall اشي اسمه lipooligosaccharide
و هو يعتبر شكل معدل من ال endotoxins و بعتبر اضعف من ال endotoxin الخاص ب meningococci
ال LOS تعبتر اصغر من lipopolysaccharide اللي موجودة باغلب البكتيريا

b. Outer membrane proteins (OMP).

ال porins بروتينات ع outer membrane بعملوا تبادل للمواد مع السطح الخارجي

- **Porins (por AB, por 1BB)**
- **Opa: Adherence protein (tighter attachment)**

هذا برضو بعمل attachment زي ال adhernce protein اللي بخلي ال attachment اقوى

3. IgA protease.

- **The main host defenses against gonococci are antibodies (IgA and IgG), complement, and neutrophils.**

- **IgA protease degrades one of these antibodies.**

برضو بيصير عنا افراز لانزيمات و اهمها ال IgA protease
ال IgA هو بروتين موجود بكل ال tissues اللي بالجسم
هو بروتين تابع لل imunne system
بساعد في القضاء على البكتيريا قبل ما تنتشر و هو اول خط دفاعي للجسم
ال gonococcus بتعمل damage لهاي المادة

PATHOGENESIS

Most common sites of inoculation:

- **Cervix (cervicitis) or vagina in the female**
- **Urethra (urethritis) or penis in the male**

من أكثر المناطق المعرضة للinfection هي الأعضاء التناسلية الذكرية والأنثوية بسبب كون الأمراض الي بتسببها هاي البكتيريا sexually transmitted infections

What Is Gonorrhea

هذا مرض بسموه السيلان هو اشهر مرض بتسببه هاي البكتيريا موجود بالmale و female

Gonorrhea is a sexually transmitted infection (STI). It's caused by infection with the bacterium Neisseria gonorrhoeae.

It tends to infect warm, moist areas of the body, including the:

- **Urethra**
- **Eyes**
- **Throat**
- **Vagina**
- **Anus**
- **Female reproductive tract (the fallopian tubes, cervix, and uterus)**

زي ما حكينا قبل انه أكثر الأعضاء عرضة للinfection هي males and females genital organs بالإضافة لمناطق أخرى تحتوي على ظروف تمكن هذا النوع من النمو والتكاثر مثل العيون والحلق الي ممكن يصيرله pharyngitis

CLINICAL FINDINGS:

هذول الامراض اللي ممكن تسببها

N. gonorrhea causes following infections.

1. Genitourinary tract infections (Gonorrhea)

2. Disseminated infection via spread through blood stream.

3. Rectal infections.

4. Pharyngitis

5. Ophthalmia neonatorum

- **Gonorrhea is spread through contact with the penis, vagina, mouth, or anus.**

- **Ejaculation does not have to occur for infection to occur.**

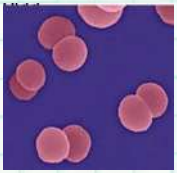
- **An infected mother may transmit gonorrhea to her newborn during childbirth, a condition known as ophthalmia neonatorum**

يحدث هذا المرض بسبب انتقال البكتيريا من الأم المصابة لابنها أثناء الولادة وتعتبر العيون المكان الأكثر عرضة للإصابة بالمولود بس خروج الرأس أولا من الرحم وقد يصاب بالعمى وأعراض أخرى مذكورة بالأسفل

- **This may cause blindness, joint infection, or a life-threatening blood infection in the baby.**

ophthalmia neonatorum

NEISSERIA MENINGITIDIS (MENINGOCOCCUS)



General Characteristics

- **Encapsulated small, gram-negative diplococci**

اول فرق بينها و بين ال gonococcus
انه هاي البكتيريا encapsulated
و هذا بمنحها القوة

- **Oxidase positive**
- **Catalase positive**
- **Can be a member of the normal flora of the upper respiratory tract**

مرات بنقدر نعتبرها normal flora عند بعض الاشخاص
هاي النقطة تعتبر من اهم الأشياء الي بفرق بينها gonococcus
عن meningococcus

- **Causes life-threatening disease when the bacteria invade the blood or cerebrospinal fluid**

بس مع انها normal flora الامراض تاعتها في ال
nasopharynx
خطيرة جدا و تعتبر life threatening disease و بفضل هذا النوع من البكتيريا السحايا وبتوجهلها بمجرد دخوله للدم

- **CO2 enhances growth but is not absolutely required**
- **Less sensitive than Niesseria gonorrhoeae**
- **Have a well developed highly antigenic capsule**

NEISSERIA MENINGITIDIS (MENINGOCOCCUS)

Structure

ال structure تبعها مشابه جدا للgonococcus

- **Pili: attachment and enhance virulence**
- **Outer membrane proteins (OMP)**
- **Lipooligosaccharide (LOS)**
- **Capsule contains polysaccharide with more than 13 known antigenic types**

في الها 13 نوع antigen و هذا يدل على التنوع تبعها
مشان هيك راح يكون صعب نلاقي دواء موحد

- **Types A, B, C, Y & W135 are more commonly associated with human disease**

Epidemiology

- **Neisseria meningitidis found as nasopharyngeal flora in 10% of healthy individuals**

تنتقل عن طريق ال coughing and szeezing
من شخص طبيعية بجسمه لشخص ممكن تسببله ضرر

- **Transmission occurs by inhalation of respiratory droplets through close contacts with infectious person (e.g., family members, day care centers, military barracks, prisons, and other institutional settings)**

عشان هيك يعتبر المطعوم لهذا النوع من البكتيريا من المطاعيم المهمة الي تعطى للأطفال وتستوجبه
بعض الدول للدخول عليها مثل المملكة العربية السعودية لأداء الحج حيث أن المرض قد ينتشر بكثرة
بالأماكن المزدحمة

- **N. meningitidis is the second most common cause of community-acquired adult bacterial meningitis in the United States.**

- **symptomatic carriage is major reservoir**

- **Lack of protective immunity and therefore reinfection , partly due to antigenic diversity of strains**

احنا بنعرف انه البكتيريا لما تفوق ع الجسم عنا
الجهاز المناعي بتعرف عليها و لو فاتت مرة ثانية ما بتسبب reinfection لكن هون الحالة مختلفة لانه هاي البكتيريا عندها تنوع كبير
في ال antigenic زي ما حكيتا فوق عندها 13 نوع antigenic مشان هيك الجسم لو اصيب بوخدة ممكن يرجع ينصاب فيها مرة
ثانية

Virulence Factors عوامل القوة لهاي البكتيريا

- **Pili-mediated, receptor-specific colonization of non-ciliated cells of nasopharynx**

اول عامل هو ال pilli اللي بعطيها القدرة انه
ترتبط بالخلايا ال non-ciliated في ال
nasopharynx

- **Antiphagocytic polysaccharide capsule allows systemic spread in absence of specific immunity**

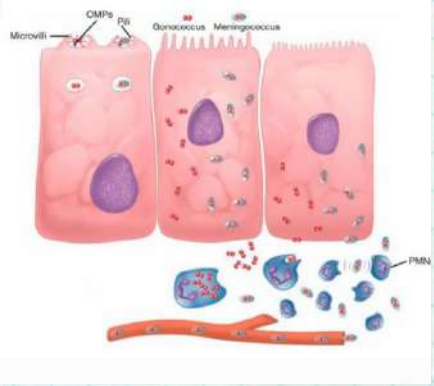
زي ما حنشوف بالصورة تحت
ال capsule بتساعدها بشكل كبير انه
تحميها من البلعمة و تخليها بتنتقل بالدم

- **Toxic effects mediated by hyperproduction of lipooligosaccharide (Endotoxin)**

ال endotoxin اللي
برضو بتكون lipooligosaccharide
بتعمل ضرر خصوصا في حالة الافراط في الانتاج

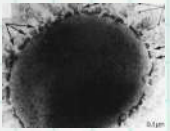
اما ال meningococcus
فيها capsule اللي بتحميها من lymphocytes
phagocytosis حتى لو صارلها
بتقدر تنجو و تدخل بال blood
و بتنقل ال infection
لاماكن ثانية بالجسم

لاحظ بالصورة كيف ال gono أنأكلت من الخلايا المناعية اما ال memingo قدرت تفوت جوا الدم



هاي الصورة بتبينلك تأثير ال capsules
ال gonococcus بدون capsule
و ال meningococcus فيها
الثنيتين بعملوا attachment بواسطة ال pilli و ال outer membrane proteins
بدخلوا على ال cells بعدين بروحوا على السايتوبلازم بعدين بروحوا على ال other site of the cell
بعدين بيصير infalmmation
بيجي ال lymphocytes

في حالة ال gonococcus لانه فش عنا ال capsule ما بتغير مكانه infection
و بيصير عنا infalmmation عادي



هسه هون راح نحكي عن الاشياء اللي بتطور المرض

Pathogenesis

- **Pili/fimbriae facilitate attachment to mucosal epithelium and invasion of submucosa**

اول اشي زي ما حكينا بعوامل القوة تاعت هاي البكتيريا انه عندها pilli
االلي بتساعدها ترتبط على ال mucosal epithelium
و تغزو المناطق تحت المخاطية مشان تقدر توصل الدم

- **Specific receptors for bacterial fimbriae on nonciliated columnar epithelial cells in nasopharynx of host**

وجود مستقبلات خاصة بال pilli تاعت البكتيريا على منطقة ال nasopharynx
بساعد برضو في تكوين المرض
و برضو هاي من احد عوامل قوة البكتيريا

- **Organisms are internalized into phagocytic vacuoles, avoid intracellular killing**

بما انه صار عندي استجابة مناعية راح يتم التهام هاي البكتيريا
البكتريا تسكت ؟؟
لا
راح تتجنب عملية البعمة اولا و بعدها تتكاثر جوا الخلايا المناعية

- **Replicate intracellularly and migrate to subepithelial space**

و بعد ما تتكاثر راح تروح للمنطقة اللي تحت ال epithelial

- **Once bacterial reach blood survival is mediated by production of polysaccharide capsule**

و زي ما قلنا فوق بتوص الدم اما عن طريق ال WBCs
او بشكل حر

- **Endotoxin release and blebbing mediates systemic manifestation like shock**

بعد ما توصل الدم بتصير تطلع بال endotoxins و blebbing على الخلايا
و هذا بكون ع مستوى systemic مش ع مستوى organs

- **Primarily infect CNS to cause acute purulent meningitis with meningococcal bacteremia and systemic manifestation**

بالاخير بوصل ال CNS
و بتسببلك مرض ال meningitis
و ال meningococcal bacteremia يعني وجود البكتيريا بالدم

هذول همه الامراض اللي ممكن تعملهم
هاي البكتيريا

Clinical Presentation

1-Meningococcal meningitis

2-Meningococcal sepsis (**meningococcemia**)

3-Meningococcal sepsis and meningitis

ممكن يصاب ب meningitis
او sepsis
او الثنتين مع بعض

1-MENINGOCOCCAL MENINGITIS

هو infection بيصير لل brain
و اعراضه تحت

- **Very rapidly progressive, fatal if not treated, disease. Mortality rates are approximately 10 to 15 percent despite antibiotic treatment**

- **The typical initial presentation of meningitis due to N.meningitidis consists of the sudden onset of**
- **fever, nausea, vomiting, headache, decreased ability to concentrate, and myalgias.**

sepsis (meningococcemia)

- **Signs and symptoms of early sepsis include:**
- **Leg pain**
- **Cold hands and feet**
- **Abnormal skin color (pale or mottling)**

هسه دخول البكتيريا للدم عنده اعراض المكتوبة فوق
اهم عرض بستدل فيه هو ال petechial rash
طفح الجلد النمري
بكون الجلد صار عليه زي خطوط شبه النمر
لونها غامق سببهم النزيف اللي بيصير تحت الجلد
يصاب فيه 50 بالمية من المرضى و غالبا ببيصير بالاطراف السفلية

- **Cutaneous manifestations:**
- **Petechial rash:**
- **Over 50 percent of patients will have petechiae upon presentation.**
- **Most frequently on the trunk and lower portions of the body.**

Laboratory Diagnosis

Specimen collection and transportation

- **Specimens: pharyngeal swab, cerebrospinal fluids, skin lesions and blood**

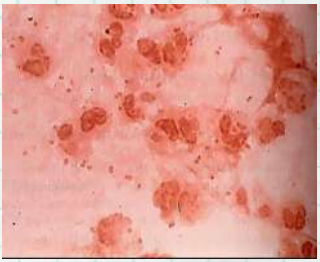
العينة بتوخذها من ال pharynx من فوق
او من السائل النخاعي او الجلد او الدم

- **Less sensitive compared to Neisseria gonorrhoeae, however quick handling is required to establish the diagnosis early**

1. Gram Stain

- **Large numbers of encapsulated, small, gram-negative diplococci (flattened along adjoining side) and polymorphonuclear leukocytes (PMN's) can be seen microscopically in cerebrospinal fluid (CSF)**

نفس اللي كنا نشوفه بال gonococcus
برضو بنشوفه هون خلايا مناعية جواها بكتيريا
و خلايا gram negative
بس الفرق انه هون بتكون capsulated



2. Culture

Media:

نفس الحكي تبع culture ال gonococcus
يما انه الثنيتين من عائلة ال neisseria

- **Thayer Marten Media (TM)**
- **Modified Thayer Marten Media (MTM)**
- **Blood or Chocolate agar**

Incubation conditions: ظروف الحضانة الماناسبة

- **Incubate at 35-37 °C for 18 hours**
- **CO2 enriched ex candle jar (5-7%)**

Colonial appearance:

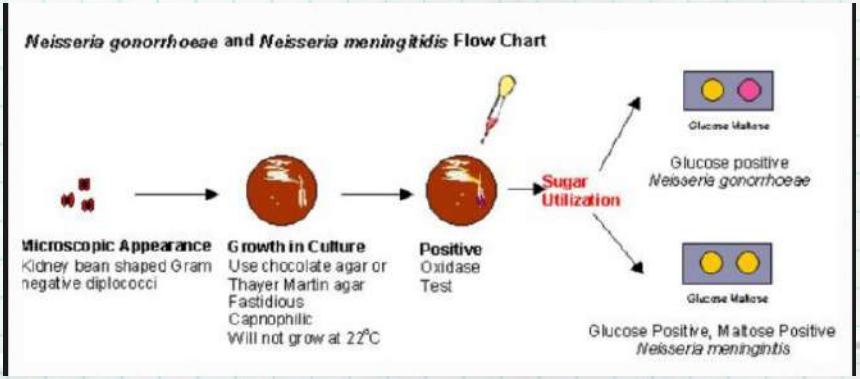
- **Medium, smooth, round, moist, gray to white, encapsulated strains are mucoid**

3. Biochemical Tests

- **Oxidase positive**

هون نفس الاشي مع ال gonococcus
هون الفرق انه ال maltose
positive

- **Glucose and maltose fermentation positive** (**while lactose fermentation is negative**)
- **Nitrite reduction negative**



4. Immunological Tests

- **The routine detection of Neisseria meningitidis capsular polysaccharide antigen in body fluids** (**CSF**) **is not recommended**

lec7 done ✅