

Gram-negatív pálcák

Füzi Miklós

Gram-negatív pálcák

- 1. Fermentáló Gram-negatív pálcák: Enterobacteriaceae**
 - a cukrok bontása fermentálással történik
 - oxidáz negatívak
 - nitrátokat nitritekké bontják
- 2. Nem fermentáló Gram-negatív pálcák: pseudomonas, acinetobacter**
 - a cukrokat nem fermentáció útján bontják
 - általában oxidáz pozitívak
 - a nitrátokat vagy egyáltalán nem bontják le, vagy elemi nitrogénné bontják

Pseudomonas Group

Pseudomonas

P. aeruginosa **P**

Burkholderia

B. mallei **P**

B. pseudomallei **P**

B. cepacia

Stenotrophomonas
(Xanthomonas)

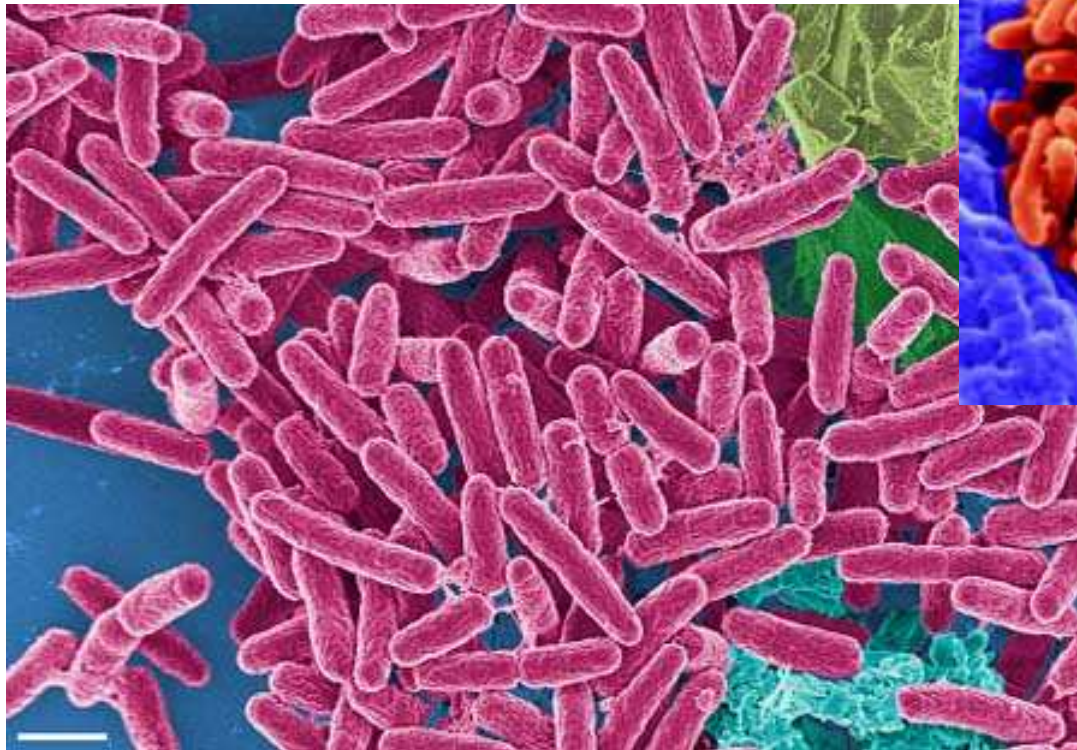
S. maltophilia

P = obligate pathogen

Pseudomonas aeruginosa

Morphology and culture:

Gram-negative rods 1-2 μm ,
no demands; Biofilm forming!



Pseudomonas aeruginosa

Pathogenesis, Infekció:

Élőhely:

Talaj, növények, víz (felszíni vizek, uszoda), szennyvíz
Human gastrointestinalis traktus (átmeneti kolonizáció)
Légutak: esetenként

Fertőzés forrása:

Fertőzött környezet
Fertőzött beteg, kolonizált személy

Nedves környezet – csapvíz, különböző kórházban használt oldatok

Átvitel: általában direkt kontaktus

Pseudomonas aeruginosa



Green pigmented colonies of
Pseudomonas aeruginosa

Pigments:

1. Pyocyanin
2. Fluorescein

Haemolysis (β)

Pseudomonas aeruginosa

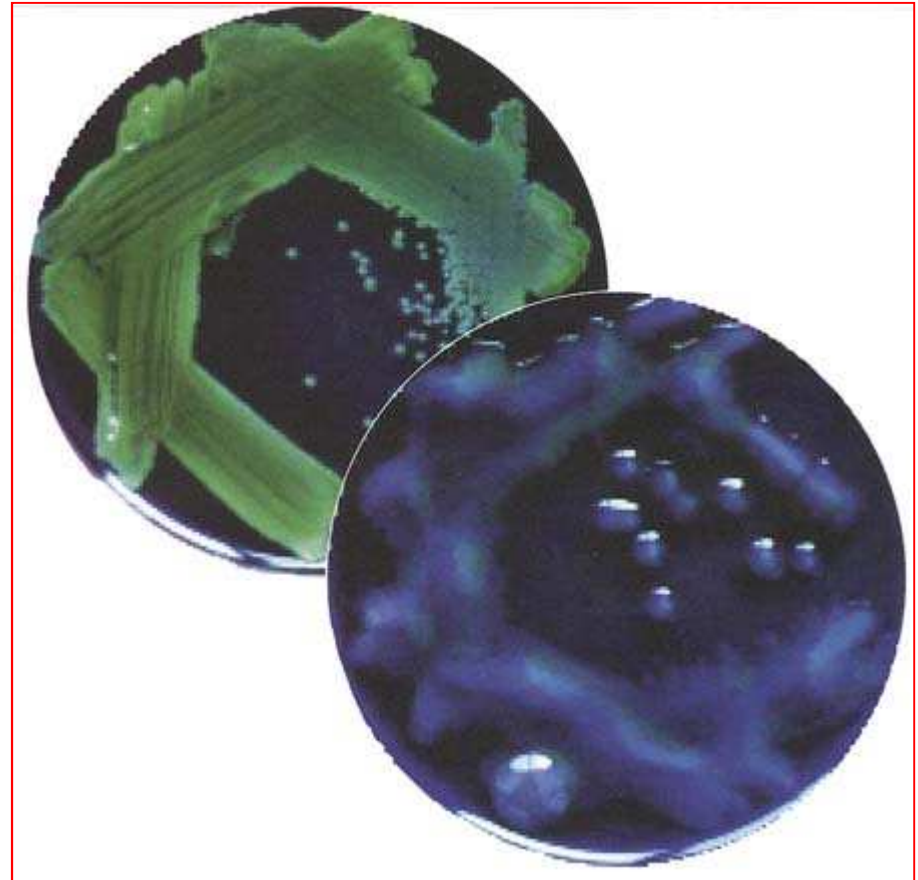
VERY RESISTANT !

- to

Heat
Light

Disinfectants

Antibiotics



Pseudomonas aeruginosa

ANTIGENS AND VIRULENCE FACTORS:

Adhaesion and Colonisation

- "O", "H"
- Pili/Fimbriae
- Capsule = Glycocalyx (adhesion, protection)
- Alginate slime = mucoid Exopolysaccharide → Biofilm

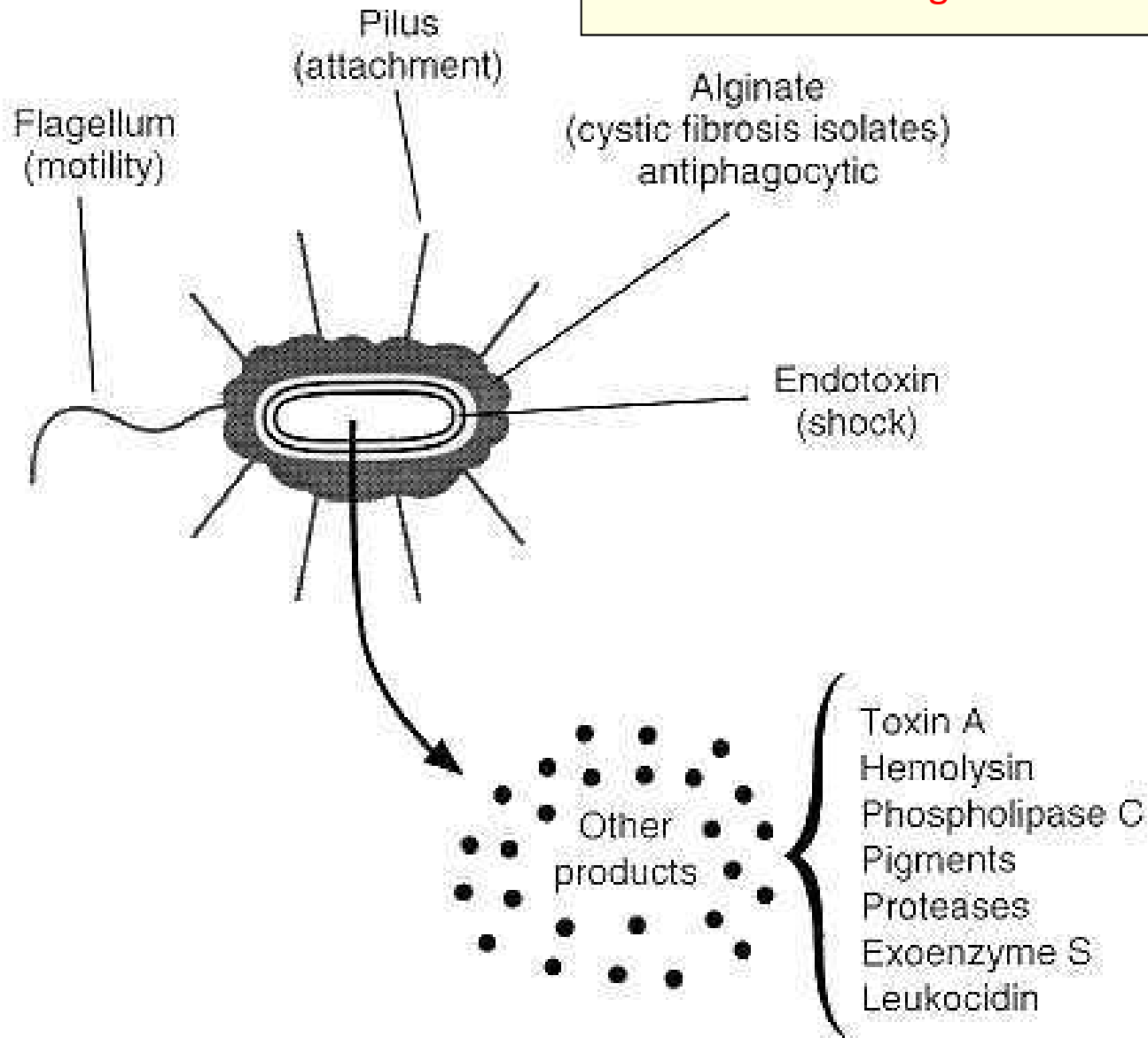
-Invasion, Penetration

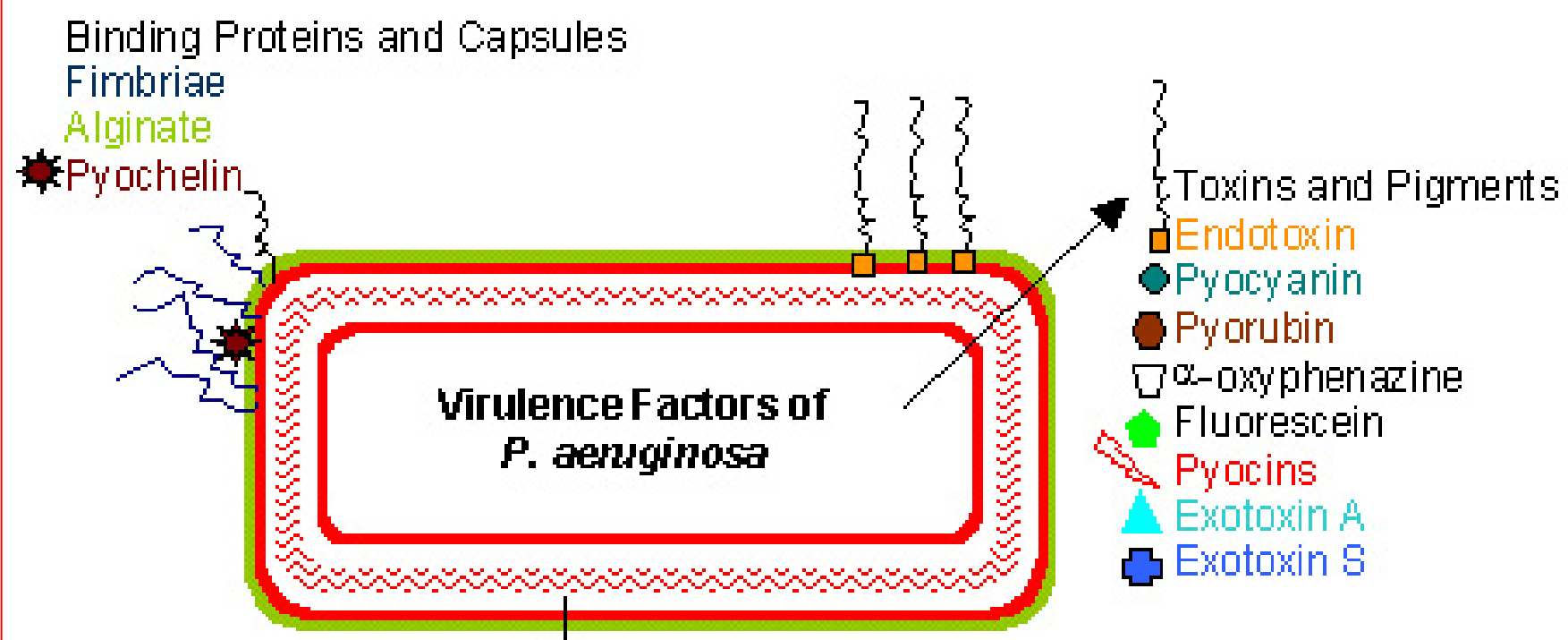
- Extracellular Proteases, Exoenzymes (many!)
- Cytotoxin = Leukocidin and Haemolysins
- Pigments

Dissemination

- **Exotoxin A** – inhibit Protein synthesis (EF2 → Diphtheria)
- Exotoxin/Exoenzyme S – cytotoxic
- Endotoxin

Pseudomonas aeruginosa – Structure

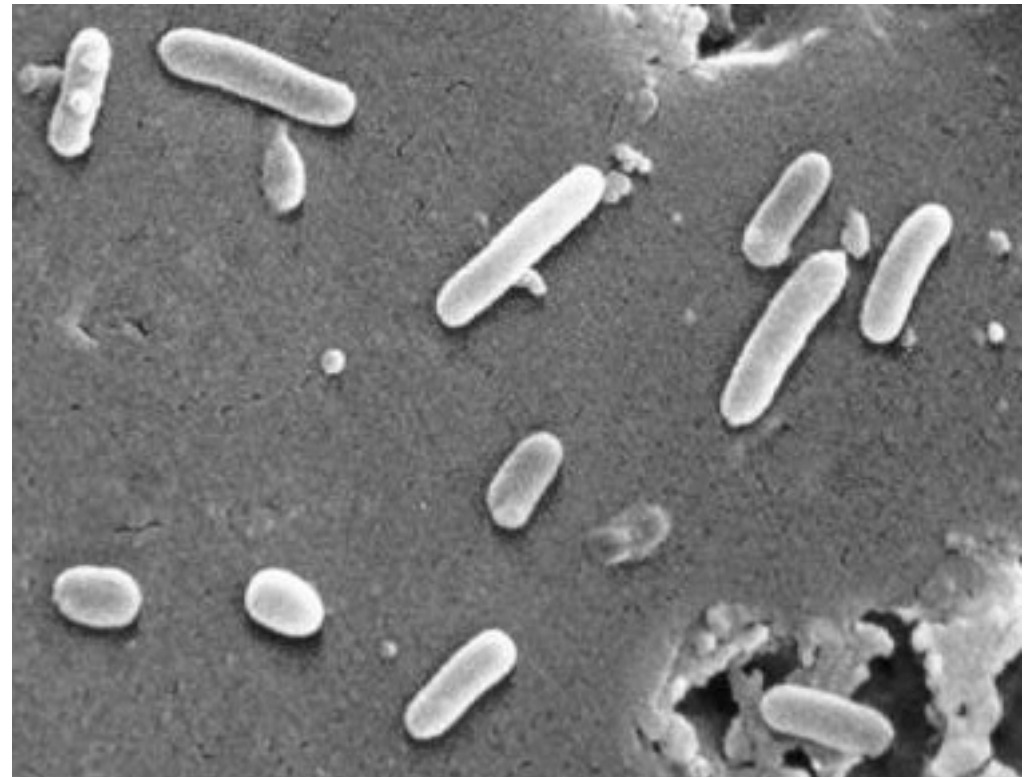
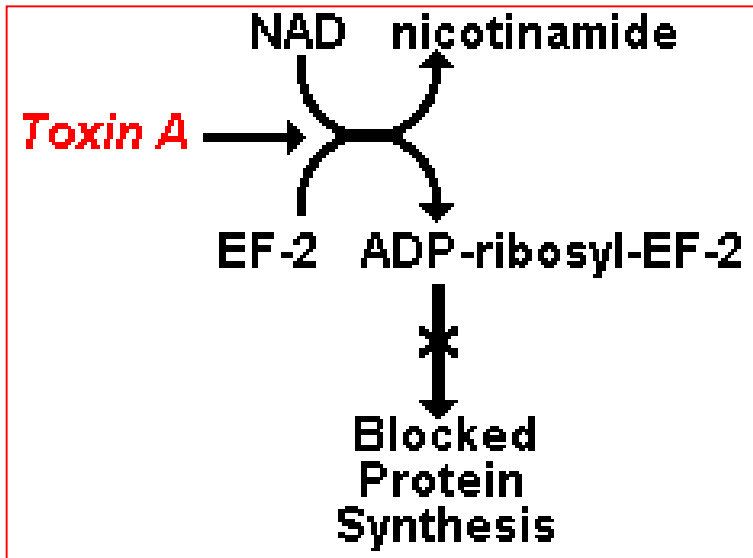




- Enzymes and Proteases
- ◆ Elastase
 - Phospholipase C
 - Collagenase
 - ▬ Gelatinase
 - ⊘ Lecithinase
 - Alkaline protease
 - ⌘ Neutral protease
 - ⌘ Cytotoxin

No single factor is decisive for virulence.

**Pseudomonas aeruginosa
Toxin-A – mode of action**



Pseudomonas aeruginosa – elmi

Pseudomonas aeruginosa

Clinical findings:

Nosocomial infections

- Meningitis, Pneumonia (Respirator!)
- Sepsis
- Burns! → skin, wounds
- Urogenital Infections (catheter),

Community acquired infections

- GI tract (!), newborn/babies
- Otitis externa
- EYE + Contact lenses

Cystic Fibrosis (mucoid strains)

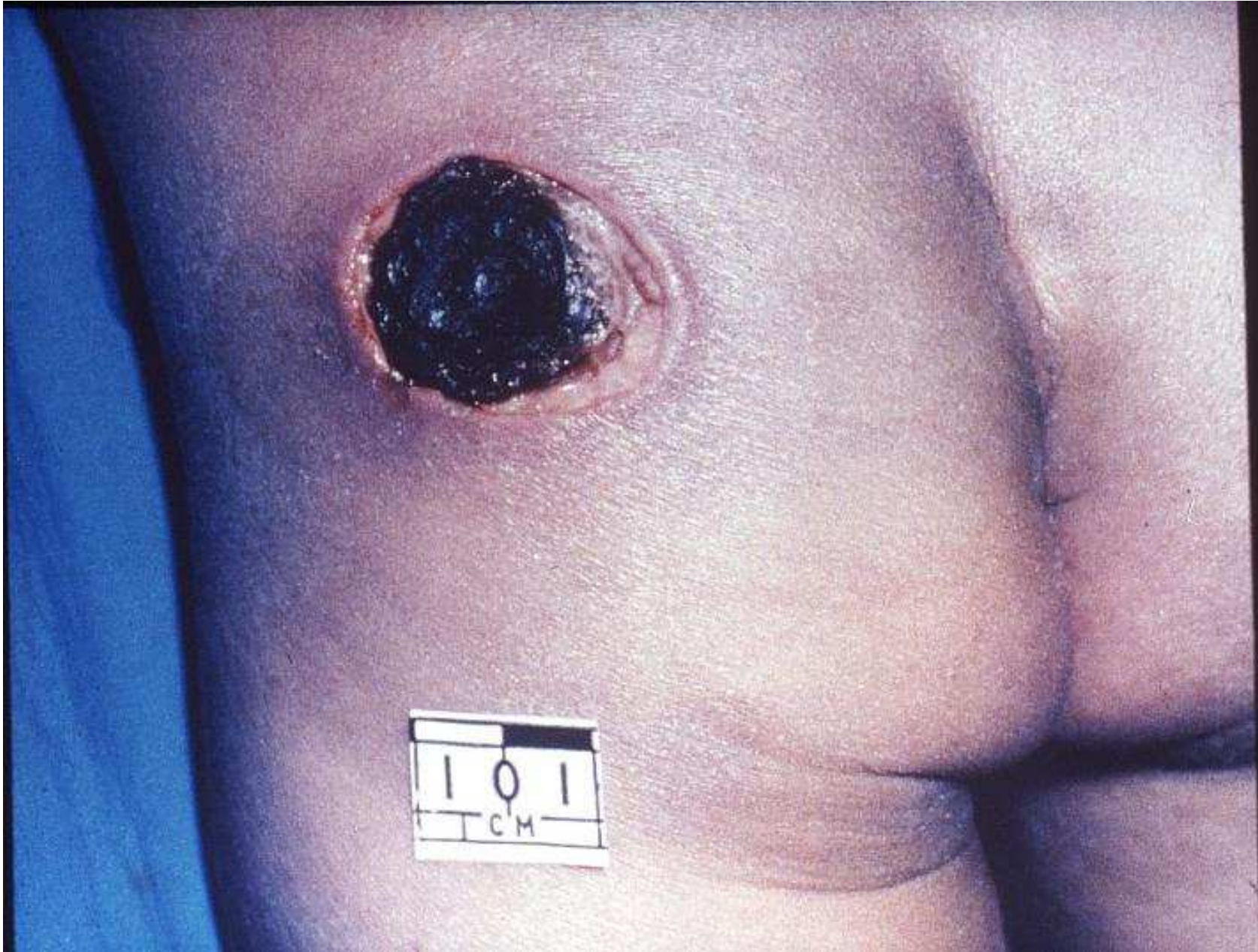


Fig. 13-6 Ecthyma gangrenosum. Necrotic round lesion on the buttock of a child with *Pseudomonas* septicaemia associated with immunodeficiency.

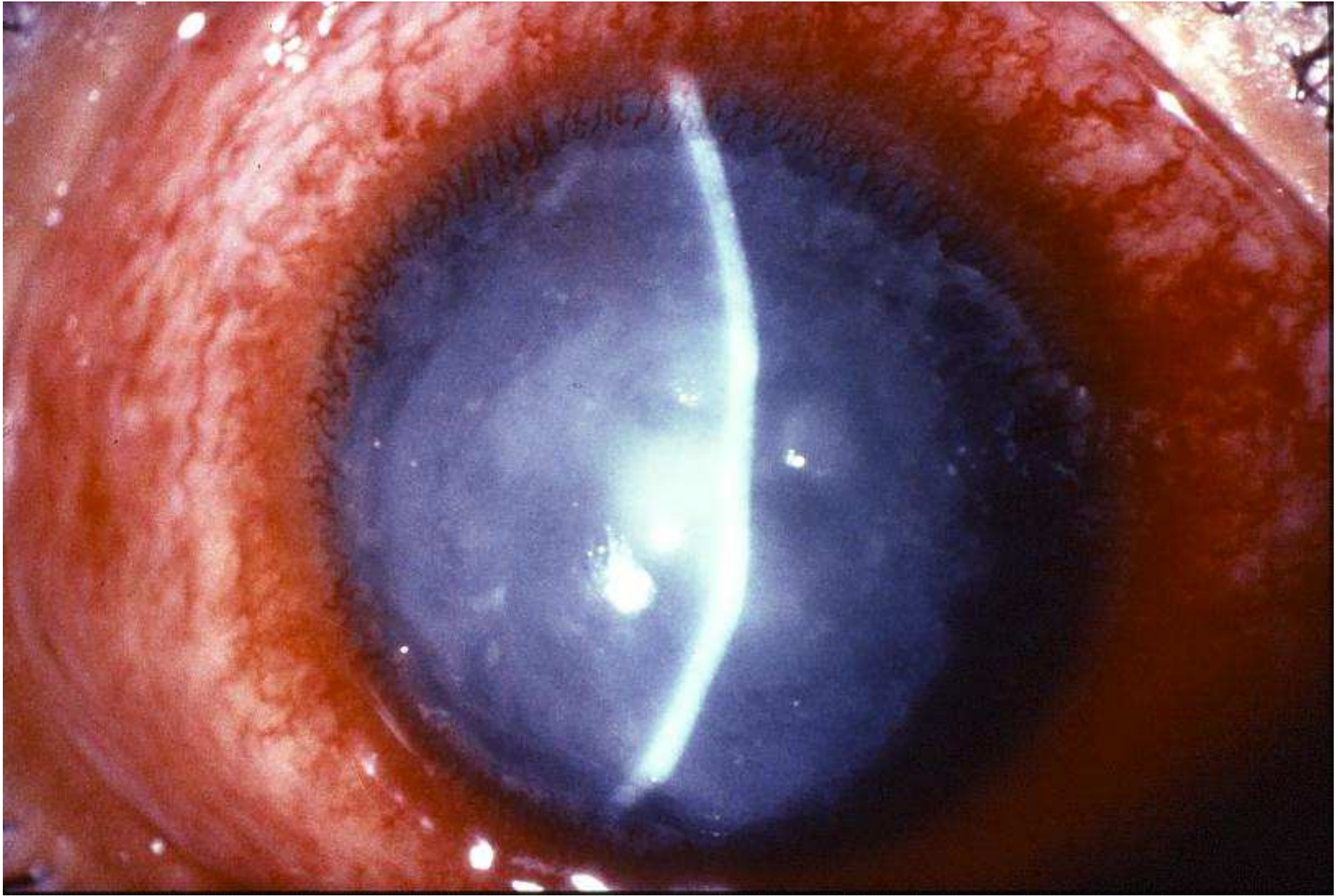


Fig. 12.46 Bacterial keratitis. Contact lens-associated keratitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. By courtesy of Dr. A.N. Carlson

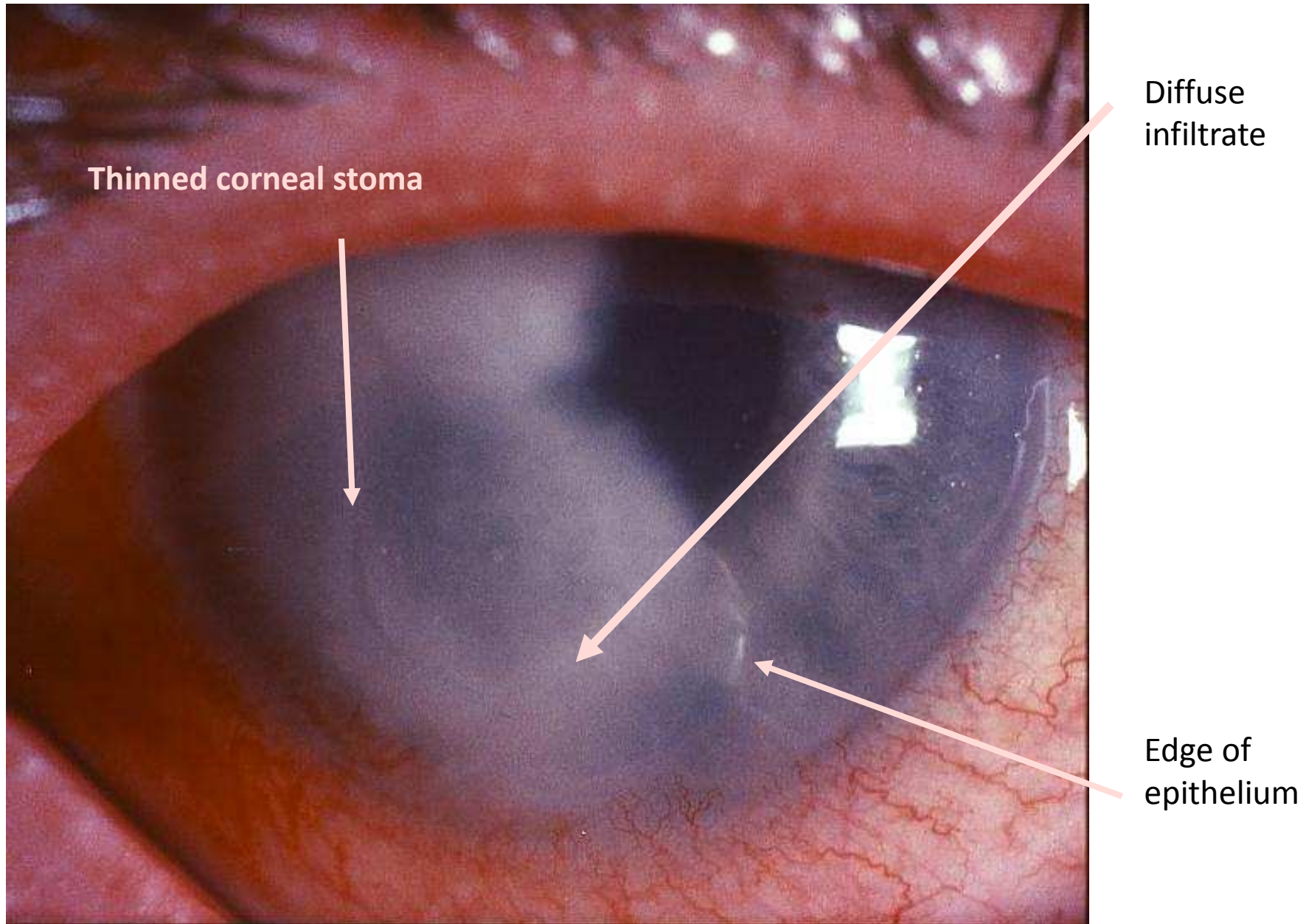


Fig. 12.47 Bacterial keratitis, in this case due to *P. aeruginosa*. An infiltrate is seen with corneal thinning. By courtesy of Mr. P.A. Hunter

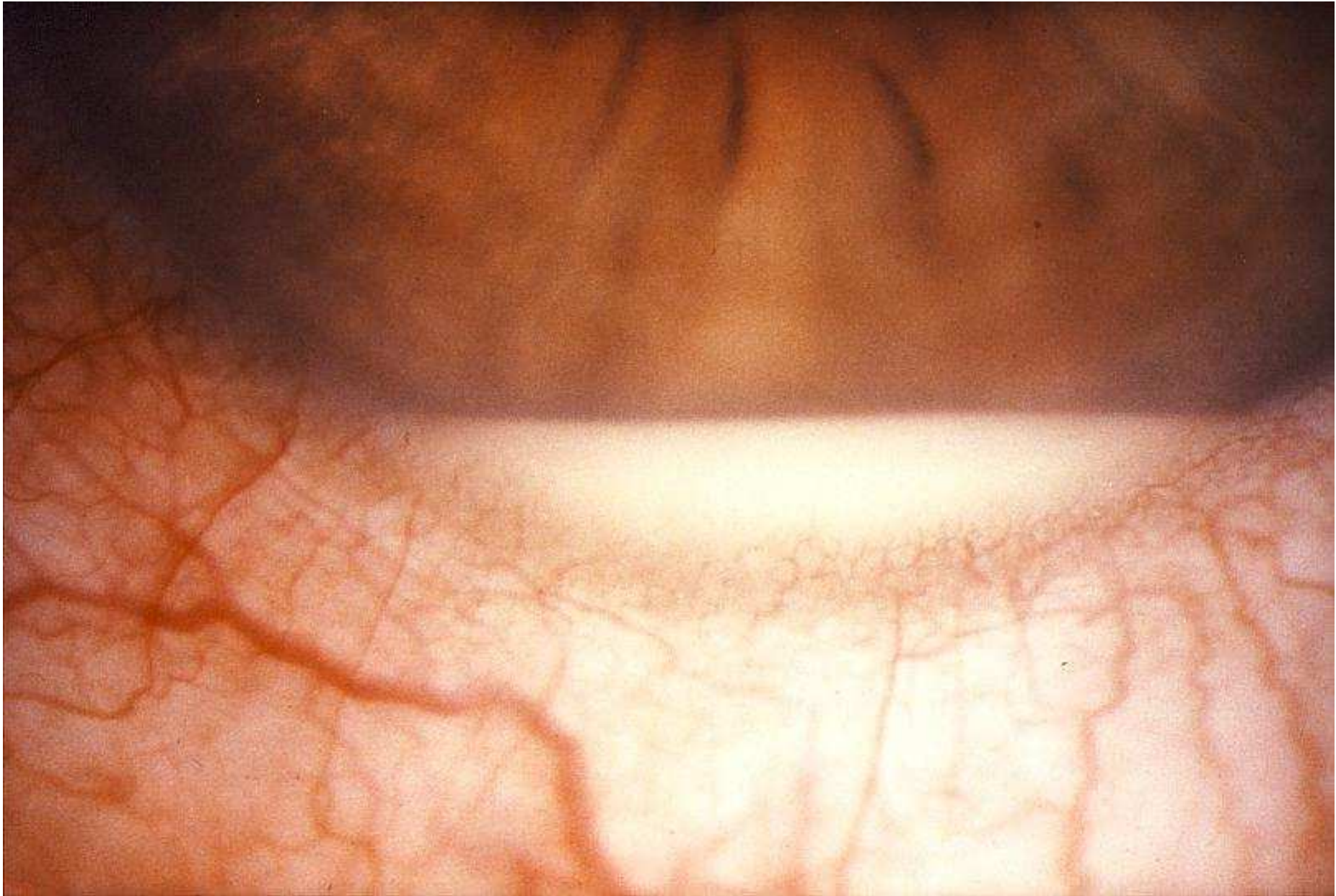


Fig. 12.48 Bacterial keratitis. A massive inflammatory response in anterior uveitis leads to precipitation of the cells as pus in the anterior chamber. This is called hypopyon. By courtesy of Mr. S. Harding

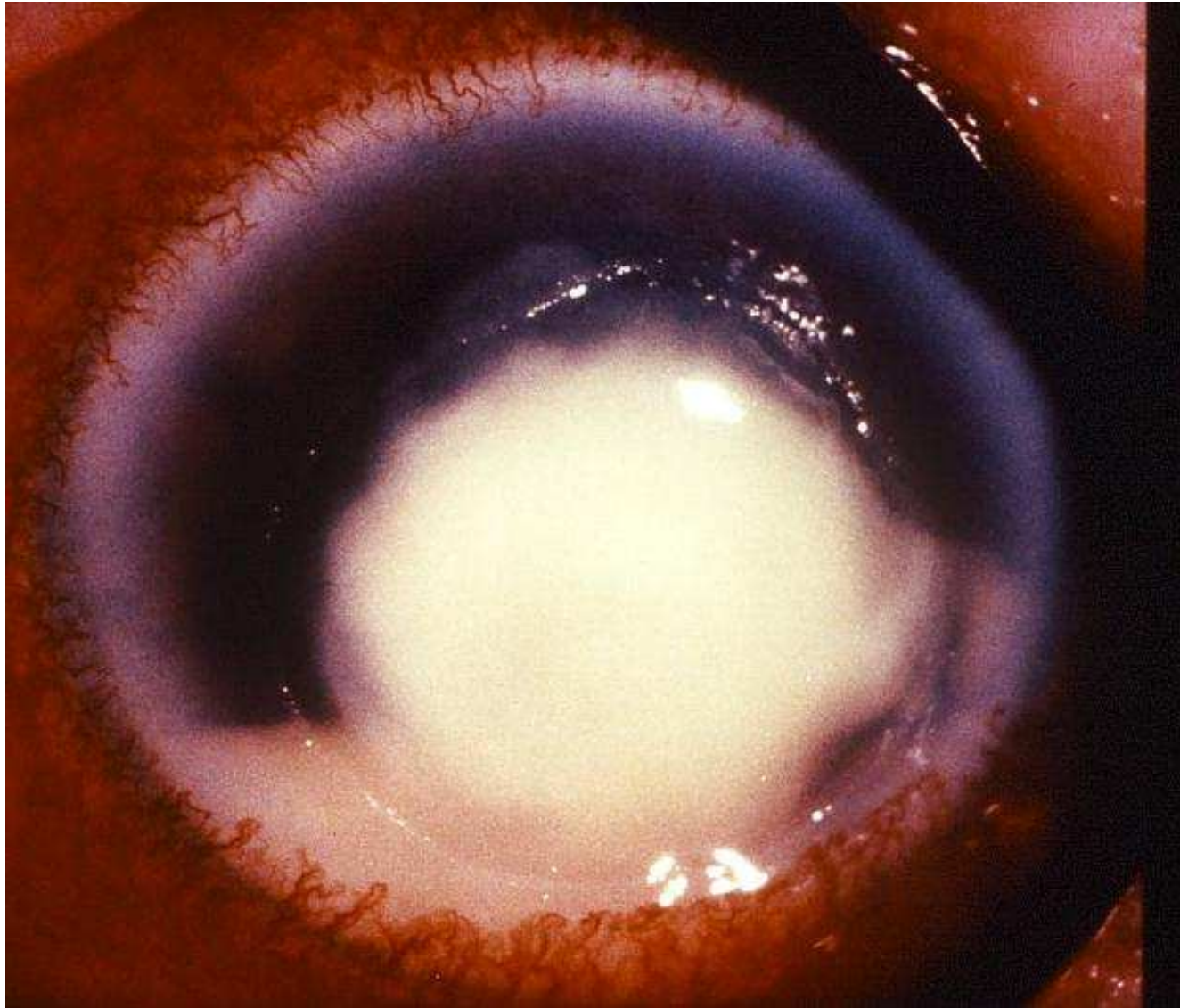
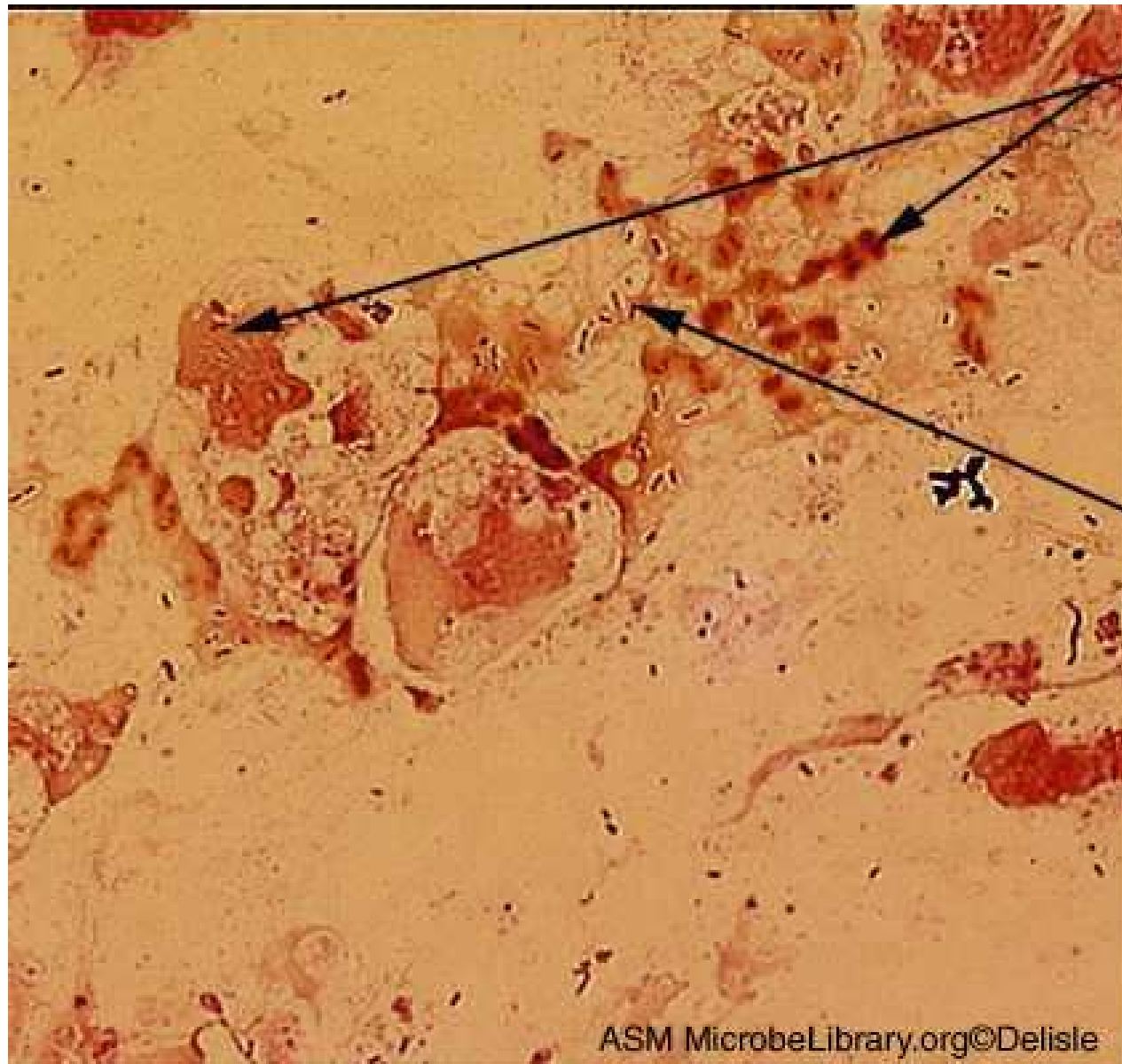


Fig. 12.49 Bacterial keratitis. *P. aeruginosa* eye infection showing corneal ulceration and hypopyon formation in this rapidly progressive eye infection.

Mucoid colonies



Pseudomonas aeruginosa



Slime biofilm with embedded bacteria

Gram-negative bacilli surrounded by halo (capsule)

Pseudomonas aeruginosa

Diagnosis:

Isolation of pathogen, identification: Oxidase +, pigment production, motility

Therapy and Prophylaxis:

Antibiogram!!!

aminoglycosides

wide spectrum penicillins

antipseudomonas cephalosporines

carbapenems

fluoroquinolones

Panresistance does occur

Pseudomonas aeruginosa

- **Legfontosabb antibiotikum rezisztencia mechanizmusok**
 - β -laktamázok: szélesspektrumú β -laktamáz
metallo- β -laktamáz
 - efflux systems
 - membrán proteinek megváltozása
- **Vakcina:** fibrosis cysticában szenvedő betegek részére

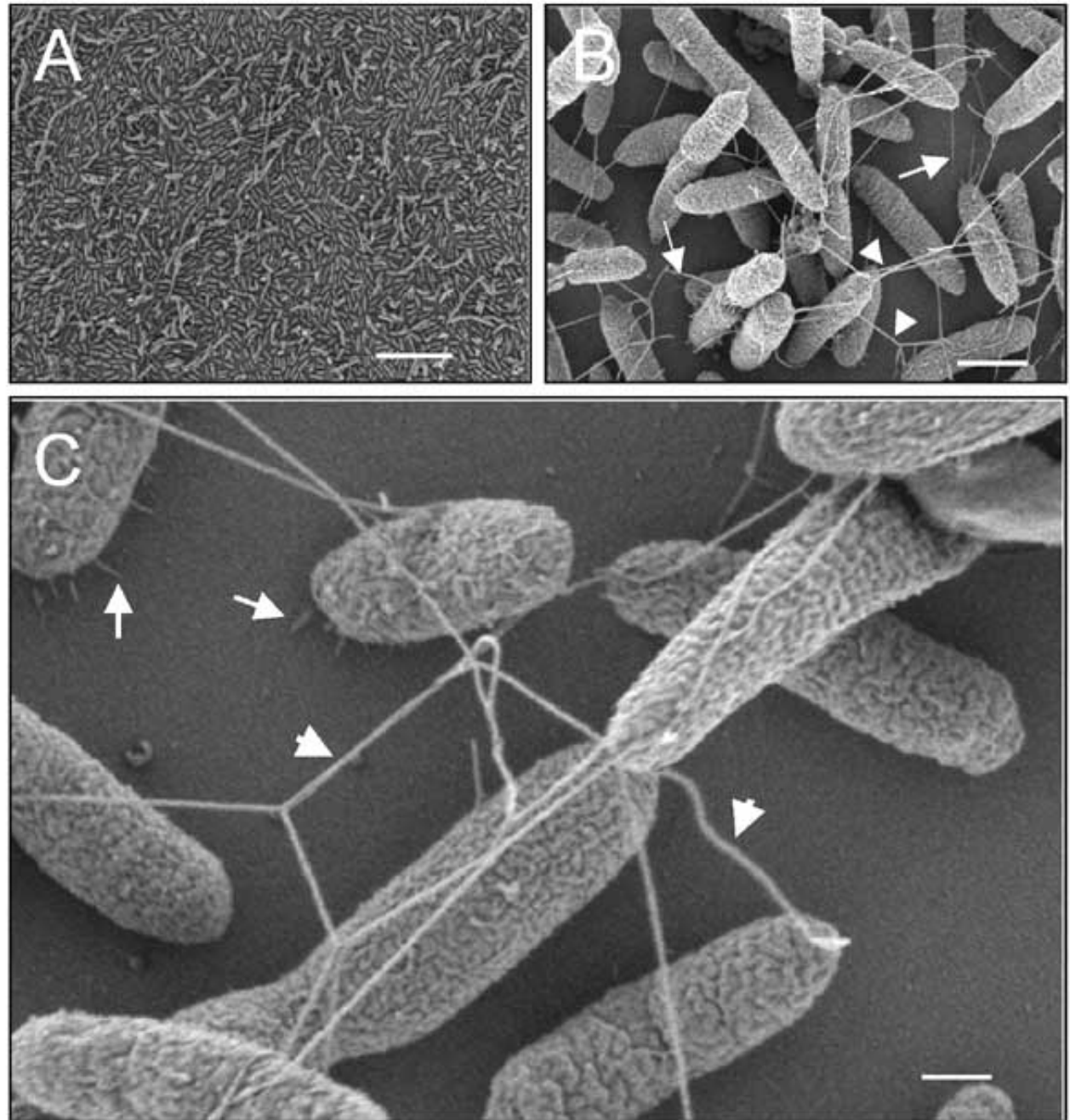
Stenotrophomonas (Pseudomonas) maltophilia

- Aerob Gram-negatív csillós pálca
- Nem tápanyag igényes; telepek pigmentáltak
- Nedves környezetben található
- A betegeket gyakrabban csak kolonizálja; fertőzést elsősorban immunszupresszált betegeknél képes okozni
- Számos antibiotikummal szemben természetes rezisztenciával rendelkezik

Stenotrophomonas maltophilia

- Fertőzés forrásai: nedves kórházi környezet; gyakran öblítésre párasításra használt oldatok
- Kolonizáció kialakulhat katéter, vénás kanül körül
- Gyakran fertőz meg fibrosis cystica-ban szenvedő betegeket

Figure 8. Ultrastructural analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* adhering to plastic. (A) Scanning electron micrographs showing the tight adhesion of SMDP92 to the plastic surface. (B) Structures resembling flagella seem to be protruding and interconnecting bacteria (arrowheads) or connecting bacteria to the plastic (arrows). (C) In addition to the flagellalike filaments (arrowheads), high-power magnification shows the presence of thin fibrillar structures connecting bacteria to the abiotic surface. Bars: A 10 mm, B 1 mm, C 2 mm.



Stenotrophomonas maltophilia



Melioidosis - Kórokozó /1/

- *Burkholderia pseudomallei*
- Gram-negatív vékony pálcák, csillós, oxidáz: +
- Tenyésztés: nem tápanyag igényes, inkubáció: 37C
24-48 óra
- Telepmorfológia: a környezettől függően erősen változó – rendkívül alkalmazkodóképes mind az élettelen környezetben, mind a szervezetben. Hétféle telepmorfológia ismert. „Okos baktérium”.

Melioidosis - Kórokozó /2/

- Reservoir: élettelen környezet /talaj, víz/ - szabadon élő amoeba?, állati, emberi szervezet
- Amennyiben a talaj fertőzötté válik, igen nehezen lehet a betegséget visszaszorítani
- Endémiás területek: Thaiföld, Burma, Vietnam, Malájzia, Észak-Ausztrália
- Sporadikus előfordulás: Indonézia, India, Irán, Mexico, Venezuela, Kolumbia, Madagaszkár

Melioidosis - kórokozó /3/

- **Genetika: hatalmas, különleges genom**
 - két kromoszómával rendelkezik
 - számos „genetikai szigetet” tartalmaz
 - túlélés
 - virulencia
 - igen nagyfokú a gének „áramlása” az egyes törzsek között
 - igen magas a repetitív szekvenciák – mutációra hajlamos helyek - száma

Melioidosis - tünetek

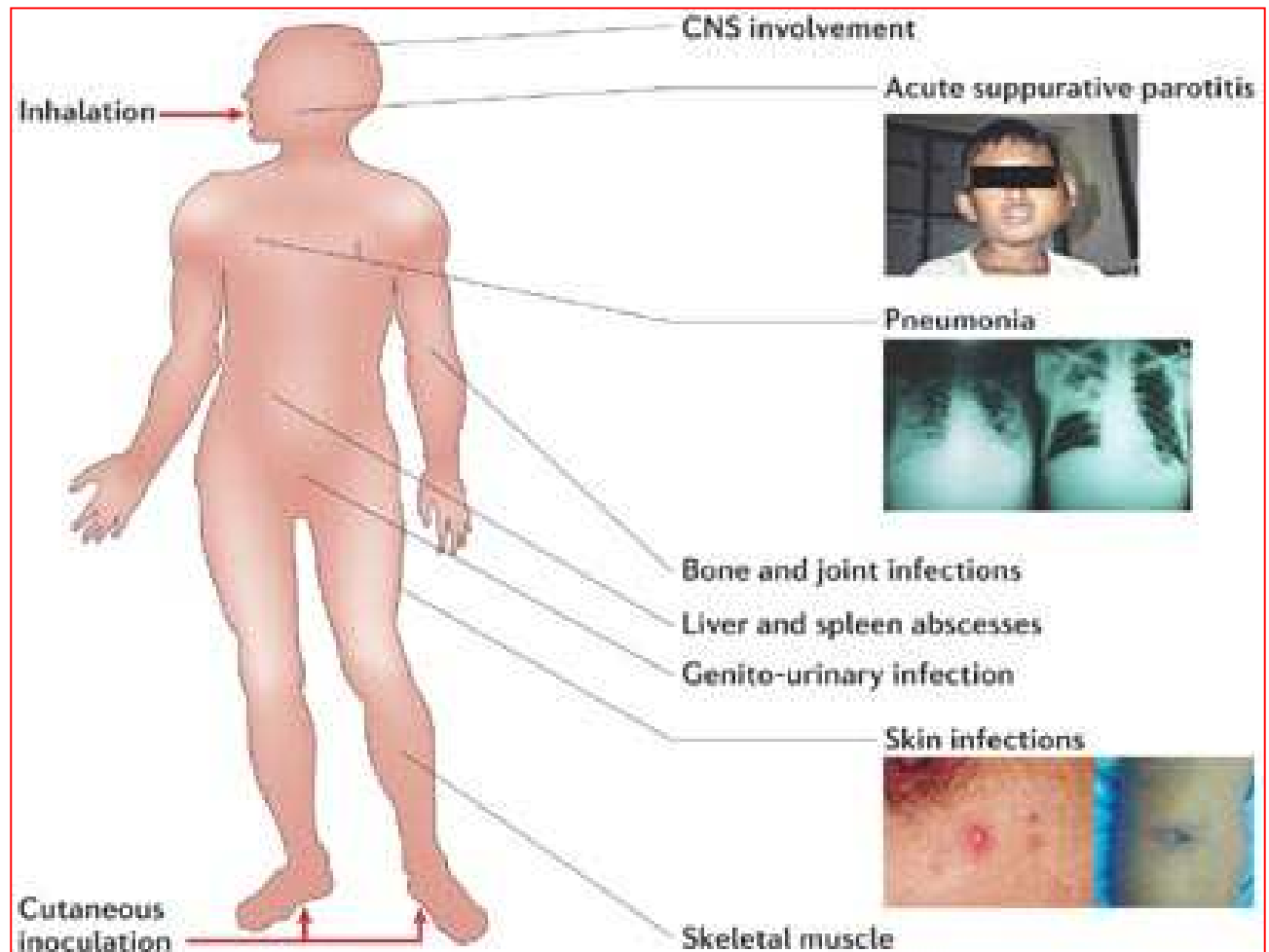
- **Fertőzés módja: bőrfelület – hámhiányokon keresztül levegő útján emberről-emberre /igen ritka esetben/**
- **Acut betegség forma: már néhány órával a fertőzést követően magas láz, elesettség, nyirokcsomó megnagyobbodás – ha a fertőzés levegő útján történt, súlyos tüdőgyulladás**
- **Subacut forma**
- **Tuberculosisra emlékeztető forma**
- **Recidiva évtizedek múlva is előfordul, a termelő ellenanyagok nem hatásosak. Valószínűleg a nyirokszervekben perzisztál.**

Burkholderia pseudomallei

Clinical finding: Melioidosis
(pseudoglanders)

– Pneumonia, Sepsis

subtropical and tropical
area



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Melioidozis – diagnózis, terapia

- **Diagnózis:** - tenyésztés /fontos a táptalajok hosszú inkubációja/
 - ellenanyagok kimutatása (nem teljesen specifikus)
 - PCR (nem megbízható)
- **Therápia:** - ceftazidim
 - meropenem

A kezelés időtartama több hónap.
- Eleve rezisztens a fluorokinolonokra, aminoglikozidokra, tetracyclinre
- Oltóanyaggal egyelőre nem rendelkezünk.

Cutaneous Melioidosis in a Man Who Was Taken as a Prisoner of War by the Japanese during World War II

Ngauy, V. et al.: J. Clin. Microbiol. 2005, 43, 970-72.

„We report a case of a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II who presented with a nonhealing ulcer on his right hand 62 years after the initial exposure. „

B. pseudomallei



Copyright © 2001 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / Dennis Kunkel

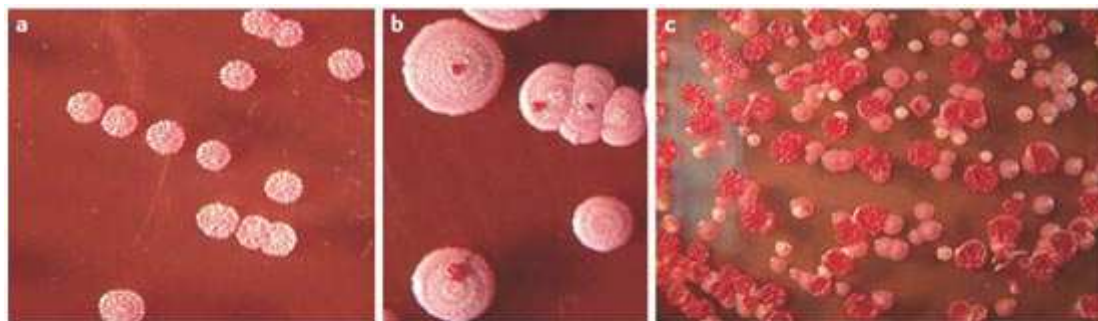


www.co.collin.tx.us



www.asm.org

B. pseudomallei



B. pseudomallei on Ashdown's agar after incubation at 37°C in air for 3 days



Burkholderia sp.

Malleus (glanders) - kórokozó

- **Burkholderia mallei**
- **Gram-negative nem mozgó pálca**
- **Genetikailag közel áll a B. pseudomallei-hez**
- **Tenyésztés: nem tápanyag igényes; inkubáció 4 nap**
- **Telep morfológia: kezdetben fehér-sárgás, később zöldes**

Tenyésztéshez: Biosafety level laboratory 3 szükséges

Malleus /1/

- **Iparilag fejlett országokban ritka**
- **Számos állatfajnál és embernél súlyos akut megbetegedést okoz; lovaknál chronikus infekciót**
- **Állatokban fordul elő; nincs természetes reservoir**
- **A B. pseudomallei-ből alakult ki gén redukcióval; elvesztette azokat a géneket, amelyek a mörnyezetben való túléléshez szükségesek (pl. antibiotikum rezisztencia gének)**
- **Jelenleg is evolválódik; egyre jobban alkalmazkodik az intracelluláris életmódhoz**

Malleus /2/

- **Fertőzés: kontakt; levegő útján**
- **Inkubáció: 1-14 nap**
- **Klinikai kép gyakran melioidozisra emlékeztet; szemből gyakran sűrű váladék ürül; minden esetben igen súlyos**
- **Diagnózis: tenyésztés, ellenanyag kimutatás /nem teljesen specifikus/, real-time PCR**
- **Antibiotikum rezisztencia: érzékeny**
- **Oltóanyag nincs**
- **Az I. és II. Világháborúban biológiai fegyverként használták; Afganisztánban jelenleg is alkalmazzák**

Burkholderia mallei

Clinical finding: Malleus (glanders) – horse, donkey

Humans: often fatal!

Occupational disease

Bioterror category B!



A horse with glanders
and with positive
mallein test



Burkholderia mallei



Acinetobacter genus

Morfológia: Gram-negatív coccobacillus; nem mozog

Előfordulás: ubiquiter (ember, állatok, növények, talaj)

Száraz körülmények között is huzamos ideig életképesek (coccoid alak csökkenti a felület nagyságát)

Tenyésztés: nem tápanyag igényesek, obligát aerobok

Biokémiai reakciók: inaktív; anyagcseréjük komplex,
oxidáz negatívok

A. baumannii: glukozt oxidatív bontja

A. Iwoffii: glukozt sem bont

Acinetobacter genus II.

Fertőzés: kontakt; levegő útján – intenzív osztályokon gyakori

Pathogenitás: elsősorban immunszupresszált betegeket képesek megfertőzni

- Pneumonia
- Sebfertőzés

Az infekciót gyakran hosszabb kolonizáció előzi meg (pl. katéter, kanül, felső légutak – intubáció)

Acinetobacter spp.

Antibiotikum rezisztencia:

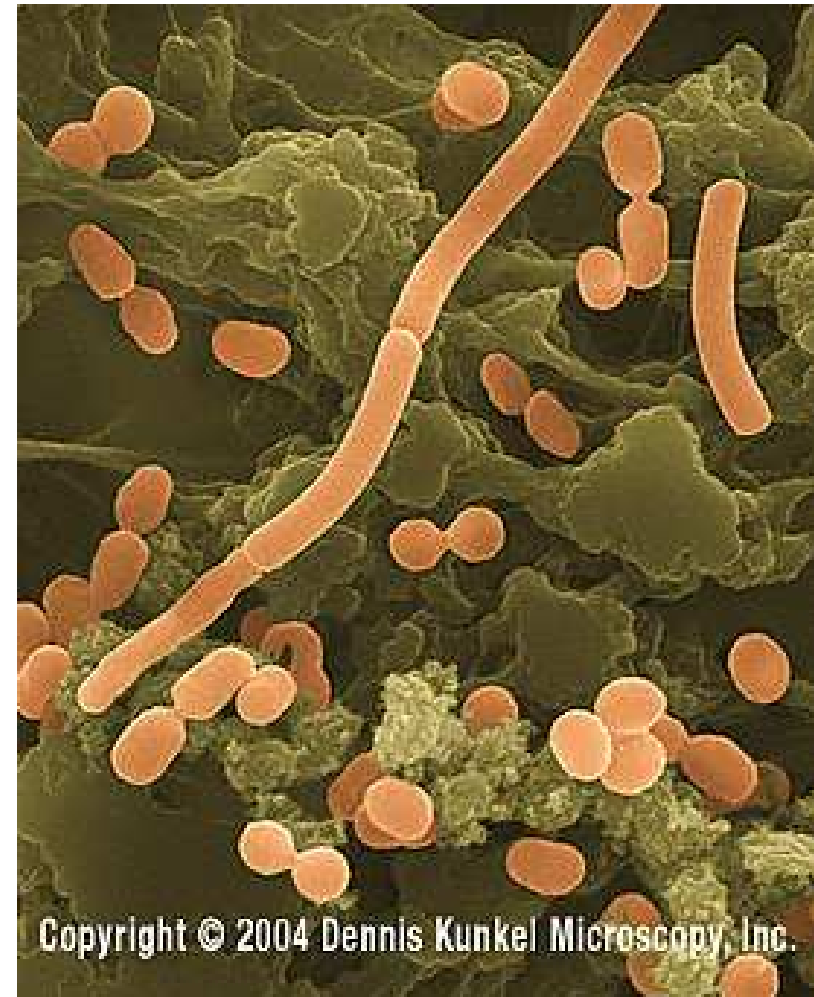
- **Általában polirezisztens; természetes rezisztenciával rendelkezik: chloramphenicol-lal, penicillinnel, gyakran egyes aminoglycosidokkal szemben**
- **A végső válaszható szerek általában: carbapenemek**
- **Pánrezisztens törzsek előfordulnak**

Acinetobacter spp.

Gram-negative dimorphic
rods, coccobacilli



www.acinetobacter.org



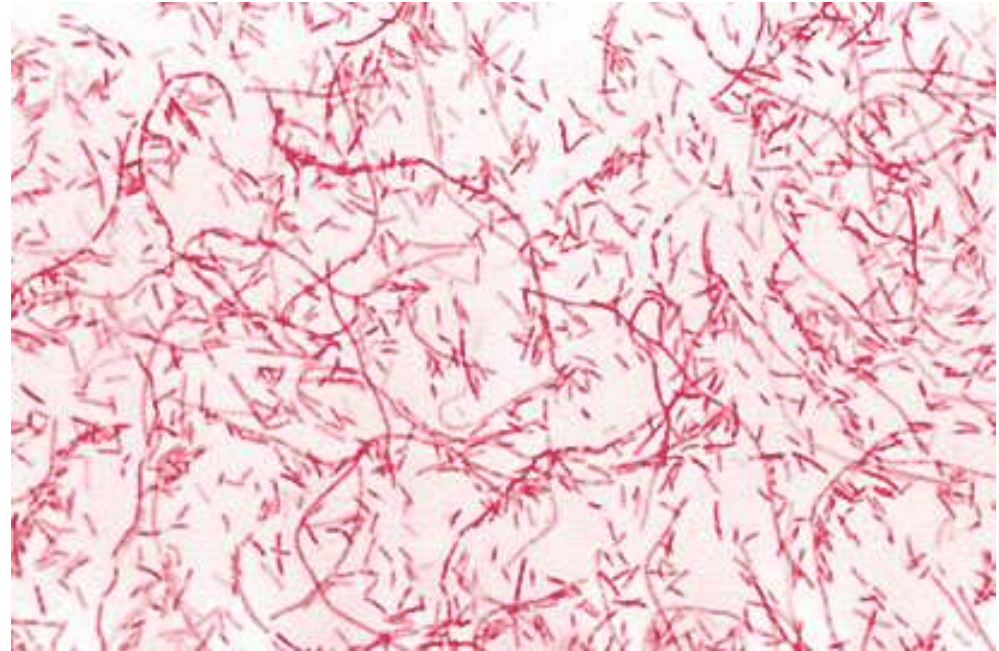
Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Legionellosis

Legionella pneumophila

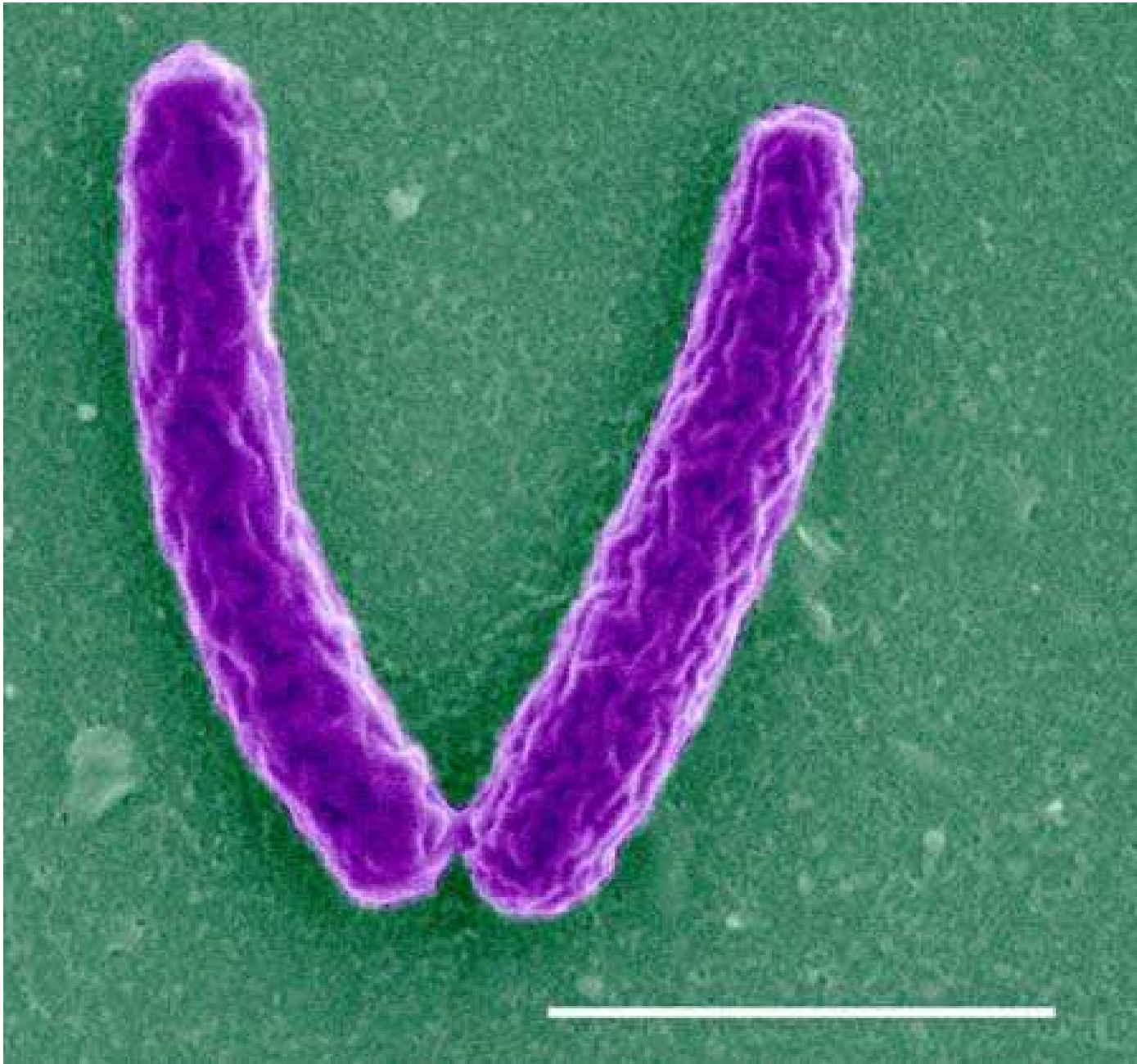
Morphology:

Gram-negative rods





Legionella



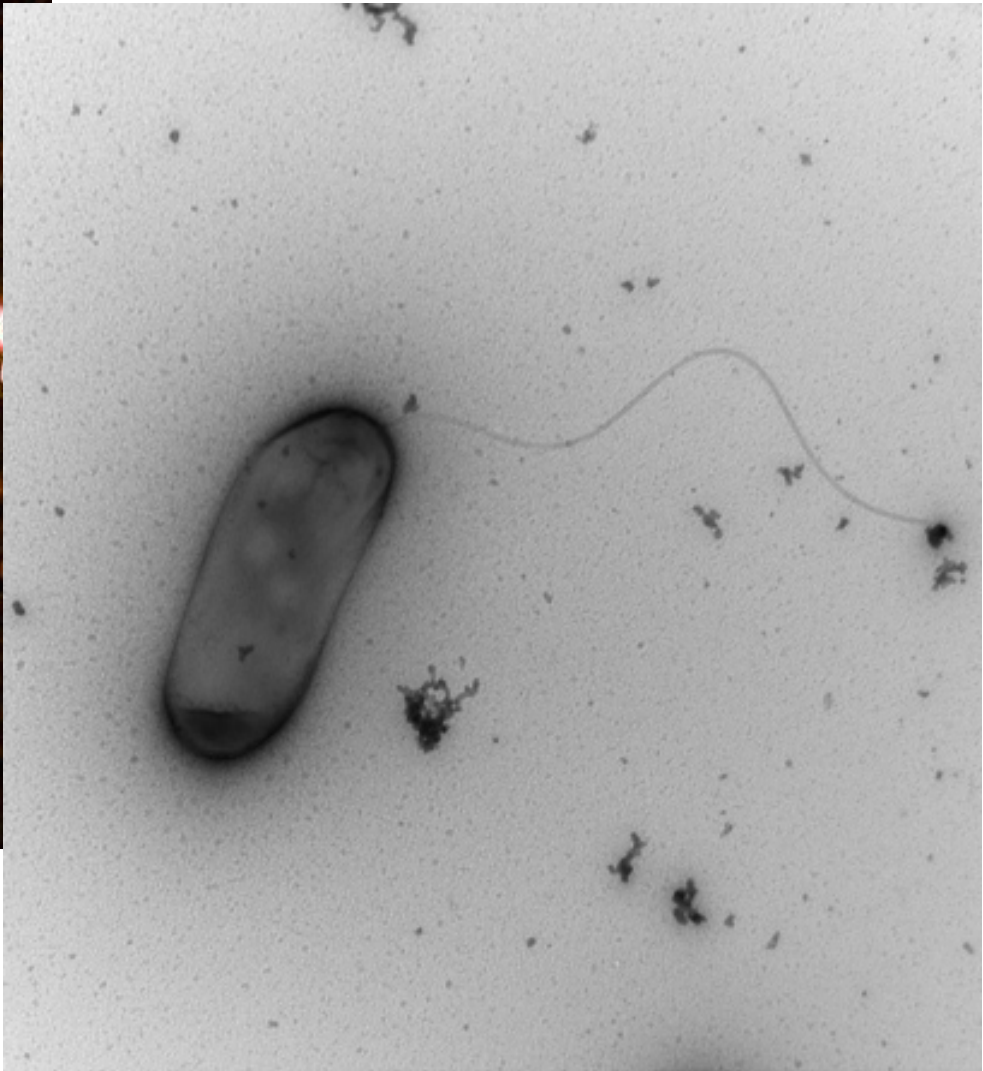
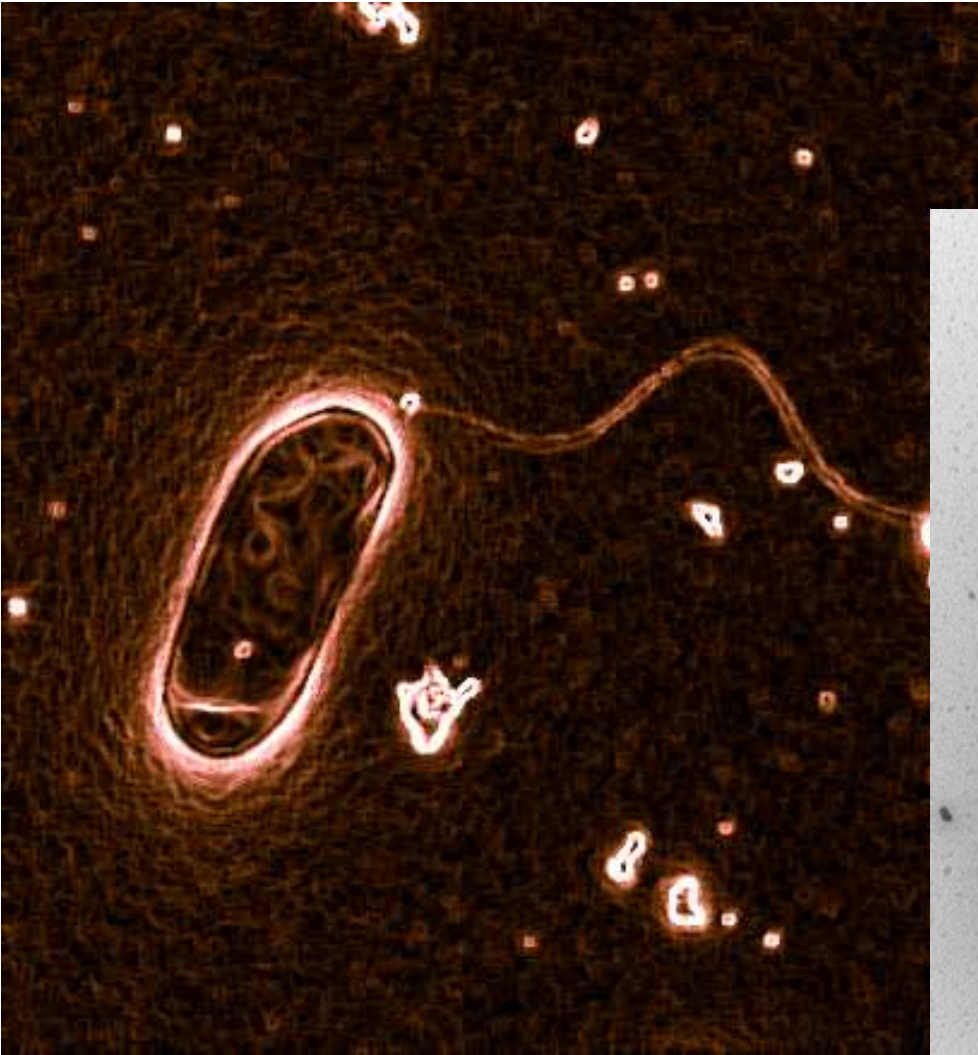
Legionella

Legionella pneumophila

Flagellum,
Fimbriae



Legionella



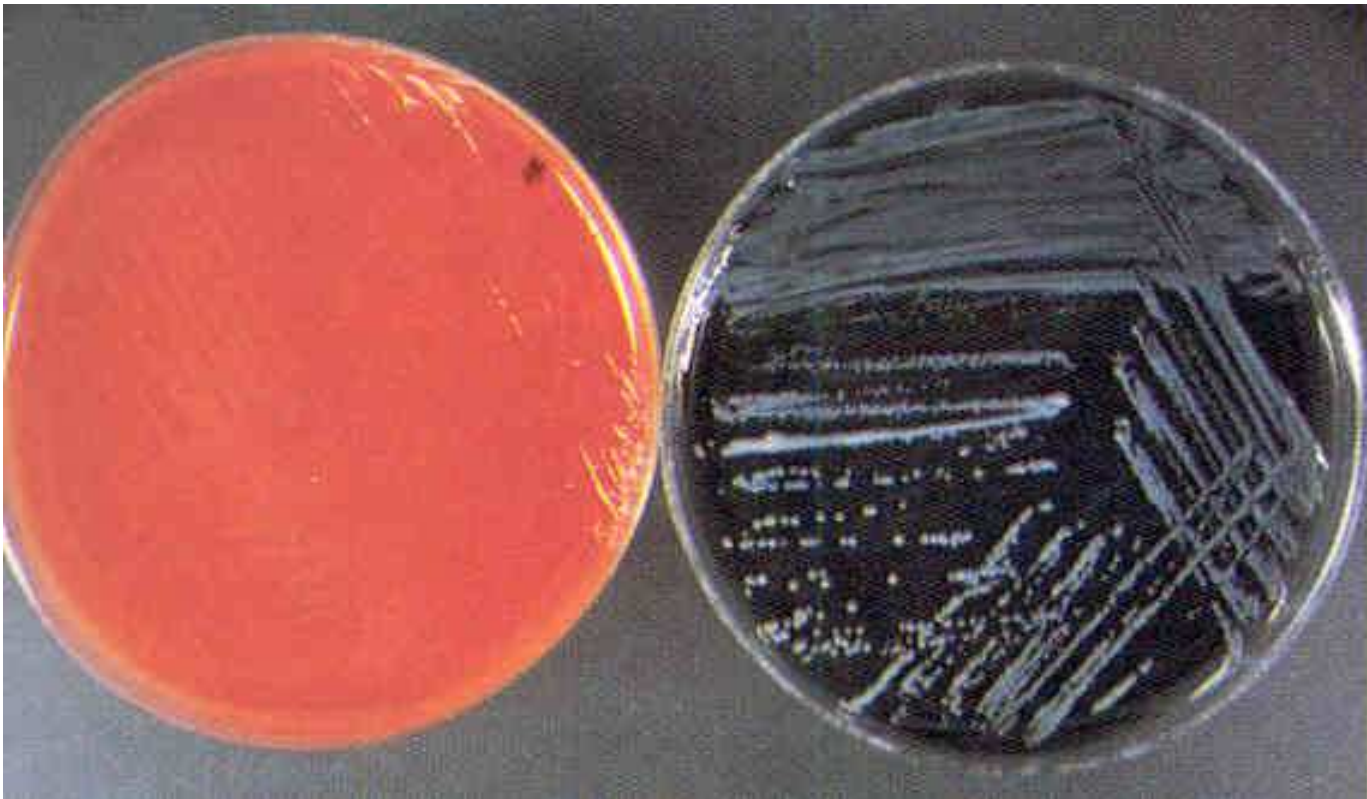
Legionella pneumophila

Cultivation: *Special Media!*

BCYE (Buffered, charcoal yeast extract)

(temperature 35°C; 3 days,
CO₂ atmosphere)

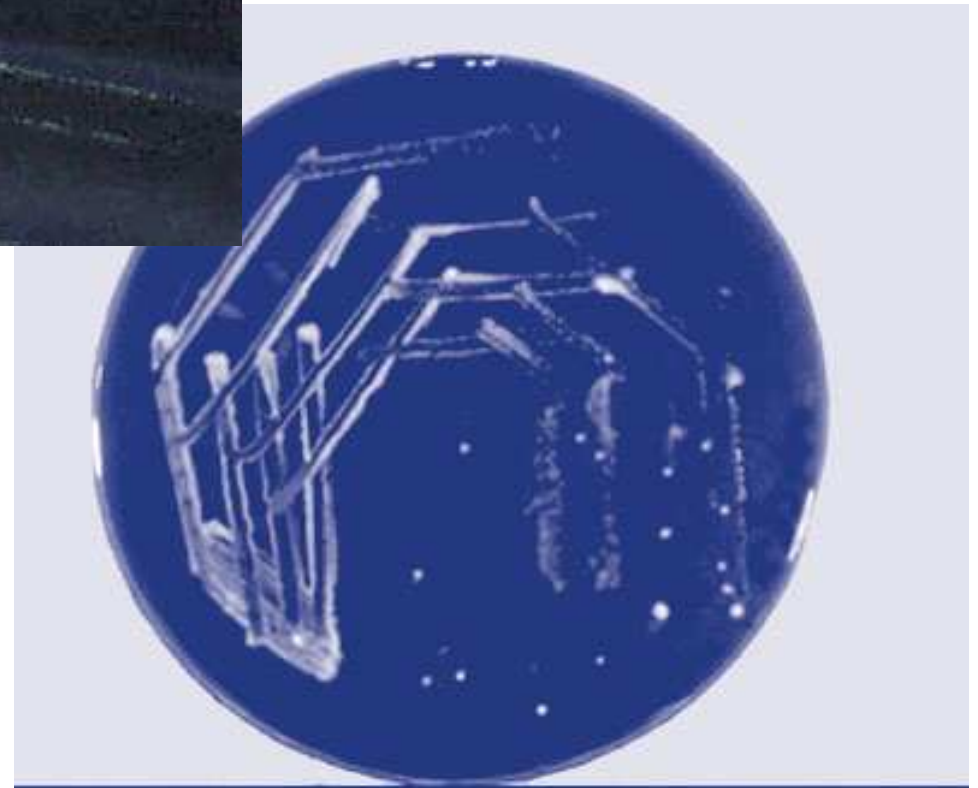
Blood agar





Legionella
Culture

BCYE





Legionella
Culture

www.contractlaboratory.com



Legionella

Legionella pneumophila

Pathogenesis-1:

Source of infection, habitat:

Wet environment

(air-conditioner, water-showers, fountains,
humidity (floor),

Biofilms!

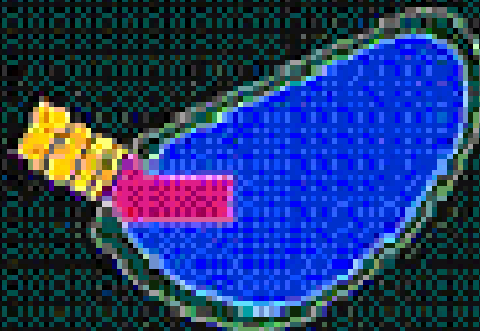
transmission:

Airborne - aerosol!

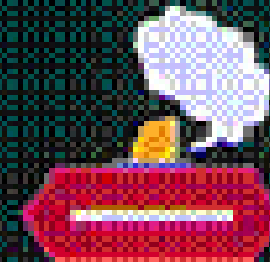
Sources of Legionellosis



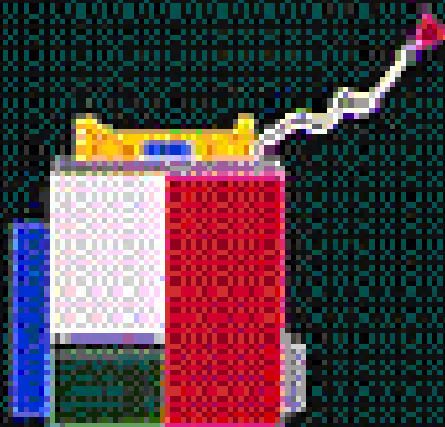
showers



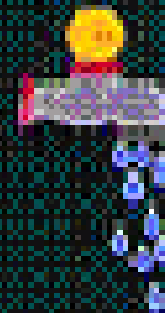
Whirlpools



humidifiers



respiratory therapy
equipment



tap water
faucets



cooling
towers

Legionella pneumophila

Pathogenesis-2:

Facultative intracellular!

In water: in protozoon

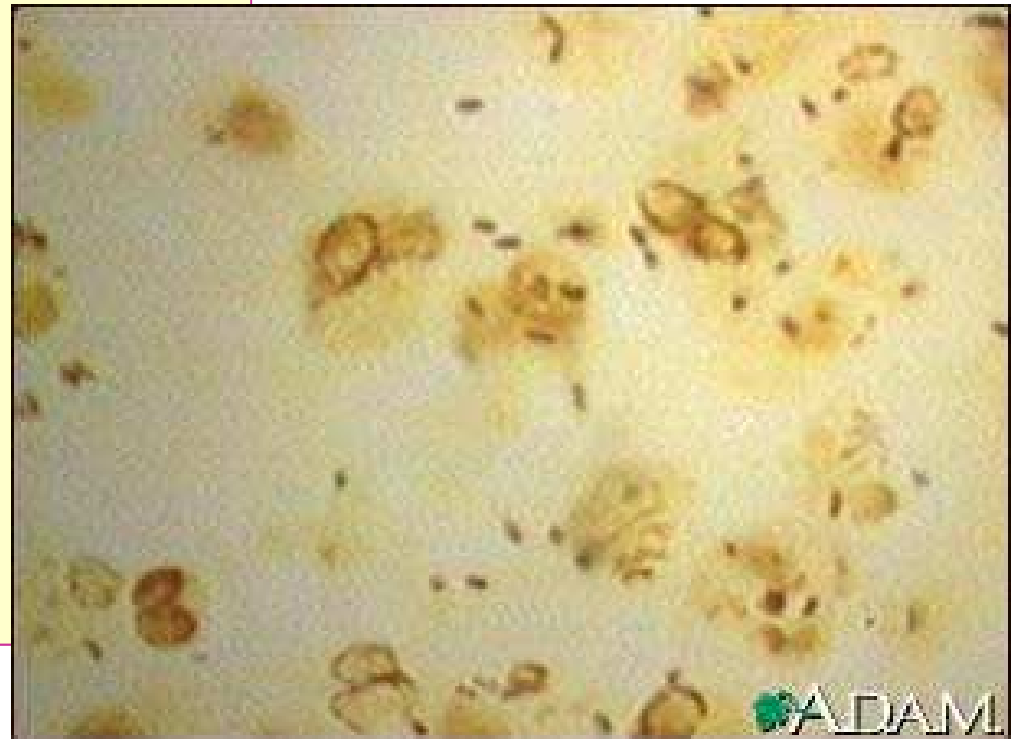
In humans:

in leukocytes,

Inflammatory reaction,

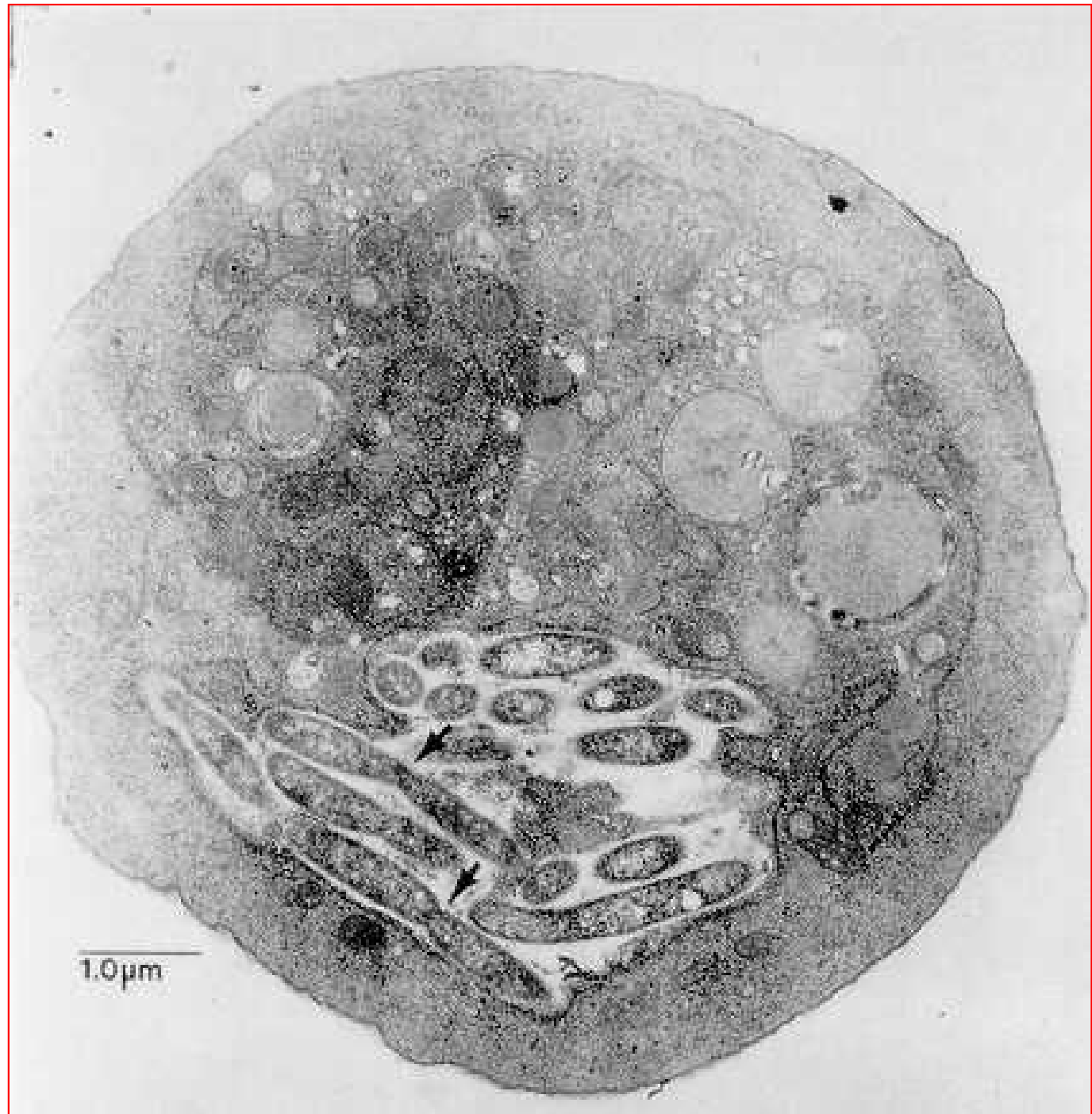
Proteases,

Phospholipases



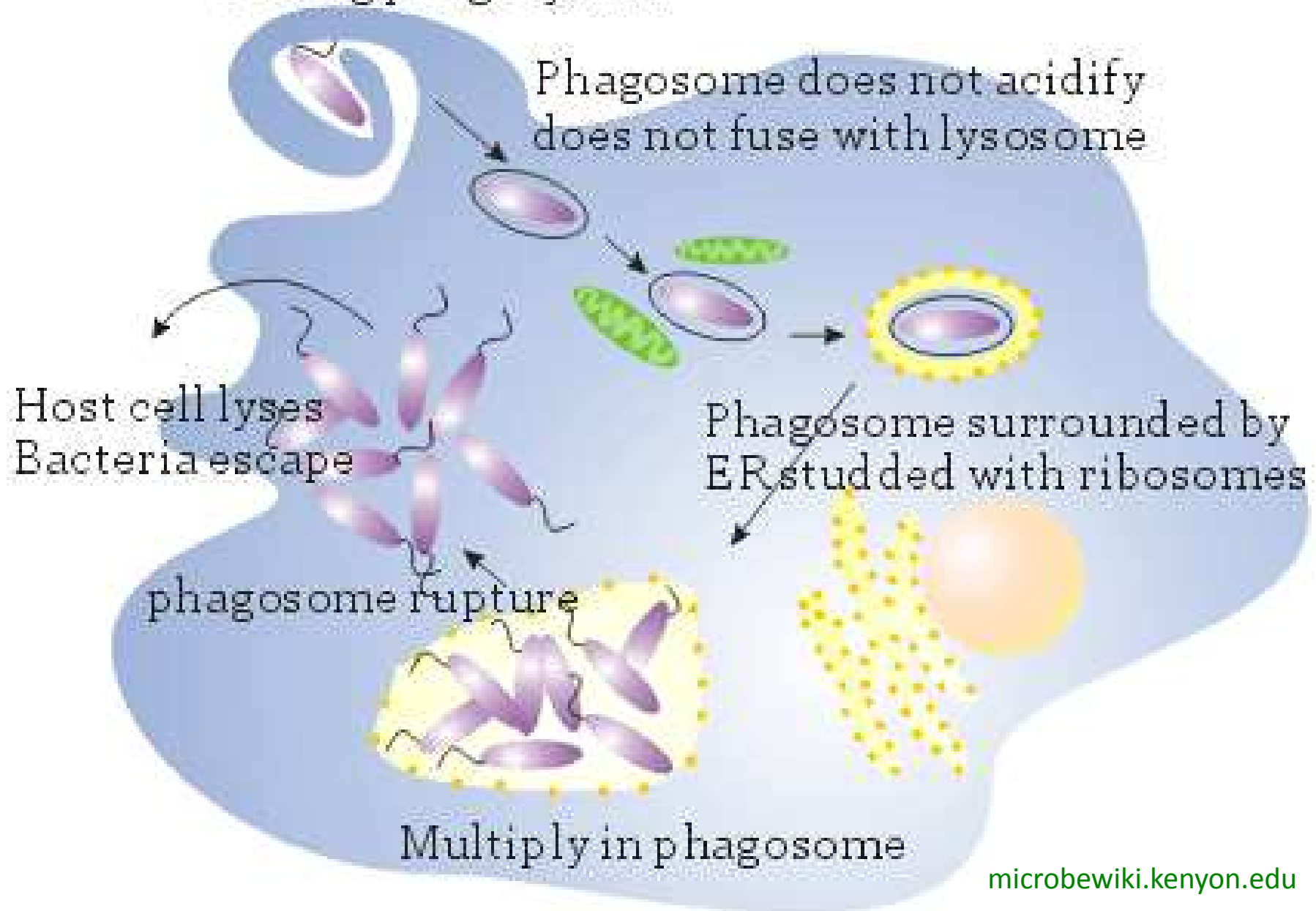
Legionella and
amoeba

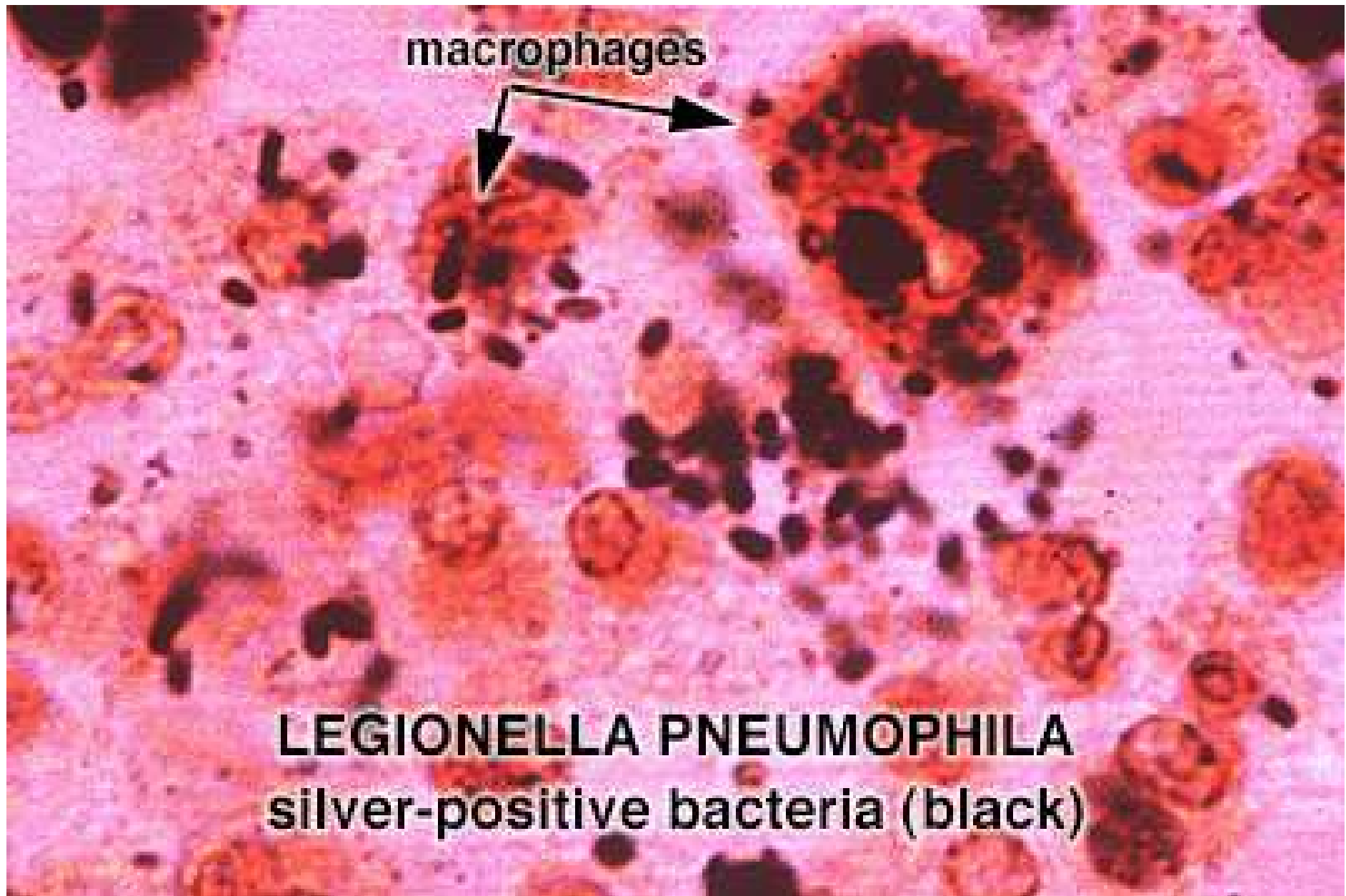
FIGURE 40-7
Electron
micrograph
showing
L. pneumophila
serogroup 1 in the
process of dividing
(arrows) within a
vesicle of an
amoeba
(*Hartmanella*
veriformis) cell.

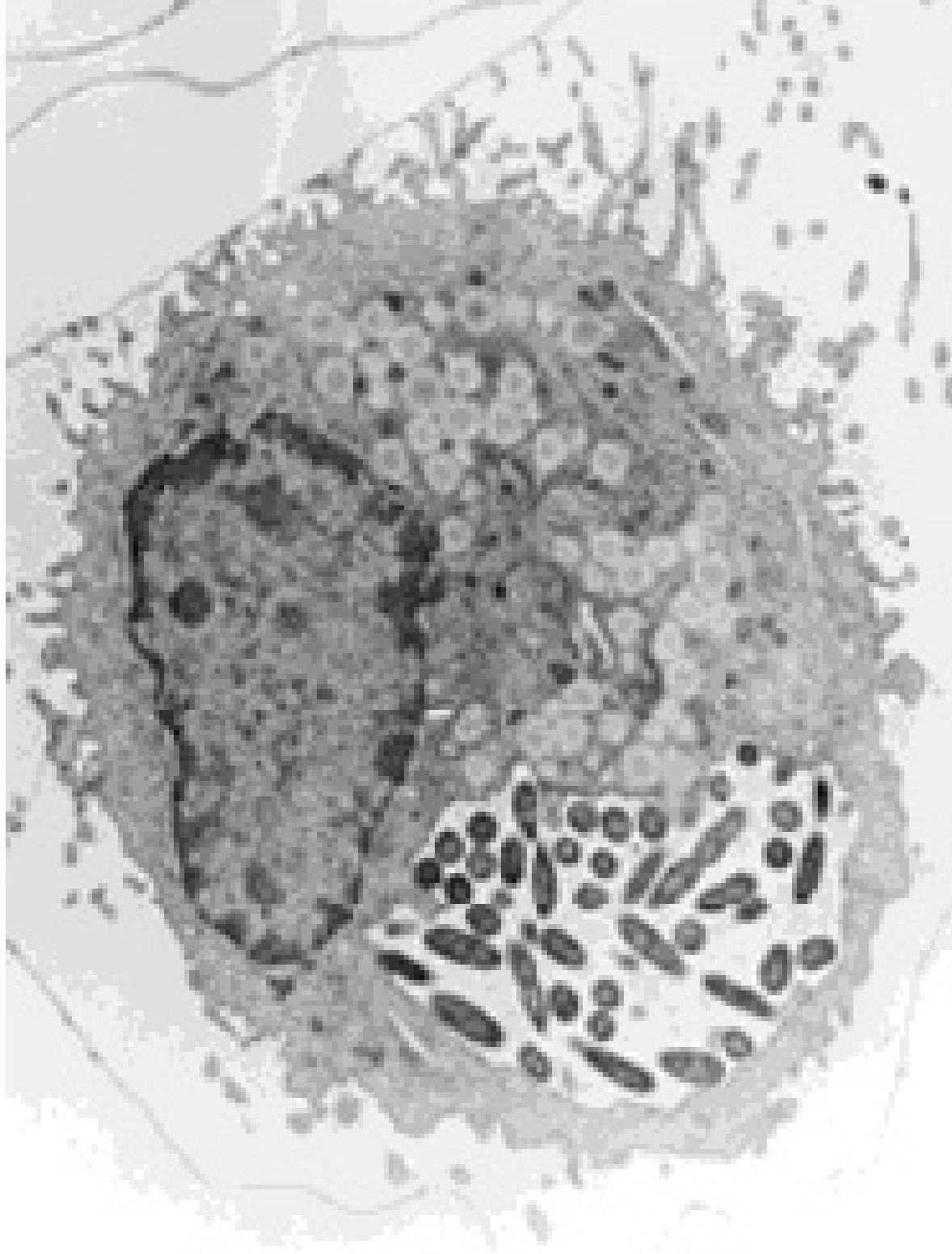


Pathogenic cycle of *Legionella*

Coiling phagocytosis







Legionella pneumophila multiplying inside a human monocyte
W. Horwitz

Legionella pneumophila

Clinical findings:

Legionellosis

1) **Pneumonia** → Legionaire's disease

2) Pontiac-Fever (non-pneumonia)

Diagnosis:

detection – BAL: direct IF

Cultivation

Direct antigen detection – Urine!

Antibody detection – Serology; ELISA

Direct detection of DNA: PCR

Therapy:

Macrolides, Tetracyclin, Rifampicin, FQ

Never β -lactams

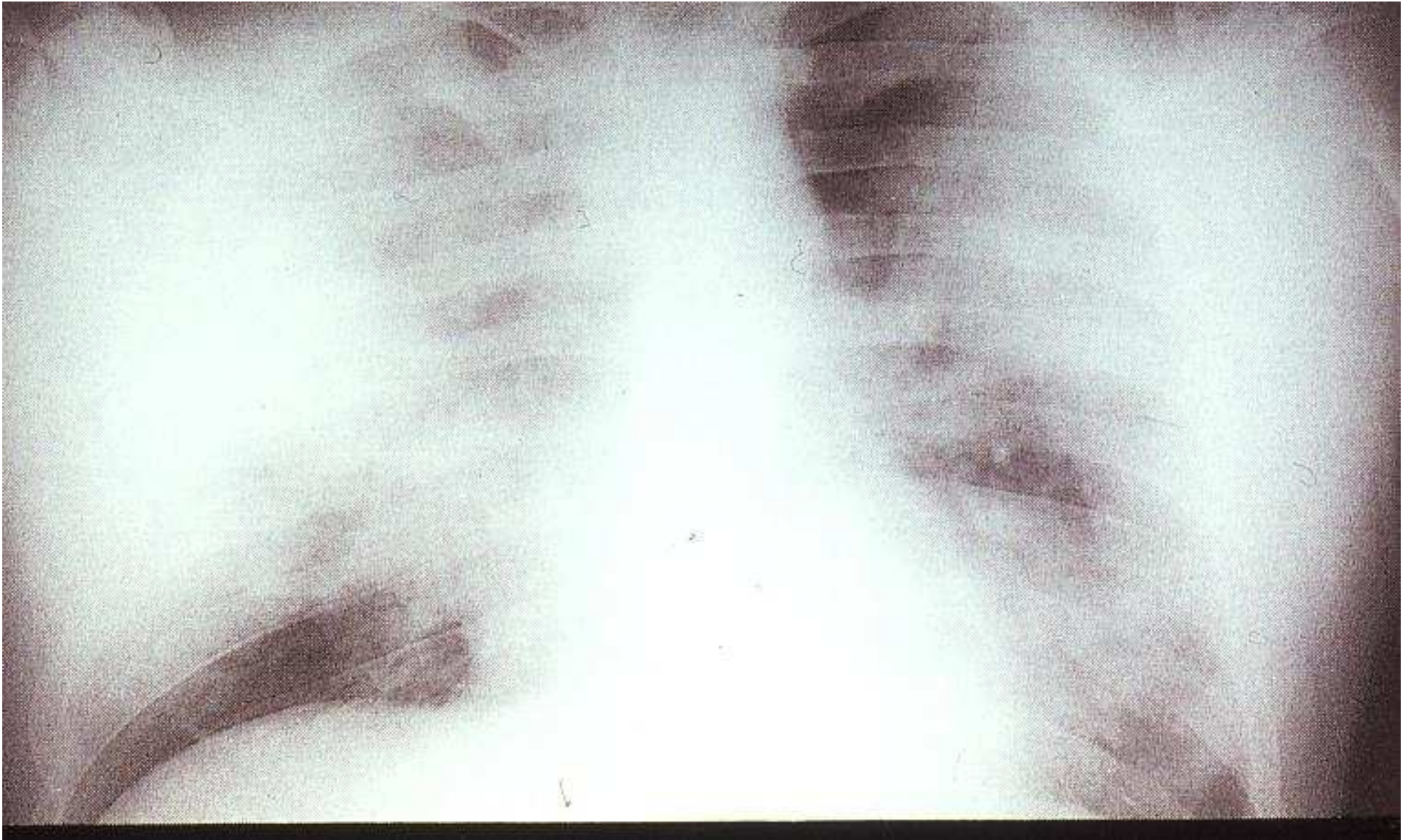


Fig. 2.29 Legionnaires' disease. Chest radiograph showing extensive consolidation affecting parts of all lobes of the lungs.



Diagnosis

Fig. 2.28 Legionella pneumophila. Specimen from bronchial biopsy taken through fiberoptic bronchoscope in a patient with fulminant Legionnaires's disease. The organism can be isolated on selective culture media or by guinea pig inoculation. By courtesy of Dr. S. Fischer-Hoch



Fig. 2.30 Legionnaires' disease. Autopsy specimen showing consolidation of upper and lower lobes of right lung.

A garat és trachea normál flórája lényegében megegyezik a száj normál flórájával

- **α -hemolizáló streptococcusok (viridans group)**
- **anaerobok**
- **apathogen staphylococcusok**
- **apathogen neisseriák**
- **apathogen corynebaktériumok**

Potenciálisan patogén aerob kórokozók a felső légutakban

- haemophilusok
- mycoplasmák
- Streptococcus pneumoniae
- Moraxella catarrhalis
- Neisseria meningitidis
- Streptococcus pyogenes - a hordozást minden esetben meg kell szüntetni /a másodlagos autoimmun kórképeket megelőzése érdekében/
- Bordetella pertussis

A bakteriális fertőzések gyakran vírus fertőzést követően alakulnak ki

A normál flóra kórokozó szerepe

- A normál flóra egyes tagjai felelősek a caries és a periodontitis kialakulásáért, amelyek a Nyugati országokban a lakosság 80 %-át érintik
- A normál flóra anaerob tagjai szerepet játszhatnak légyszöveti mélyebb fertőzések – általában abscessusok - kialakulásában

Streptococcus viridans group

(*S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*,
S. salivarius)

Heterogenous collection of α -haemolytic Streptococci
„viridae” – Latin term for green.

Member of the normal flora of the oral cavity.

- 1) **Morphology:** Gram + cocci
- 2) **Cultivation** on blood and chocolate agar: α - haemolysis
 - Separate from ***S. Pneumoniae***: normal flora optochin R
 - clinical picture: - endocarditis lenta (subacute)
 - dental caries - *S. mutans* (mainly serotype c)
(7 serotypes a-g)
 - colonization of the urinary tract



Istanbul, 2006

THE END

Oxidációs-fermentációs próba

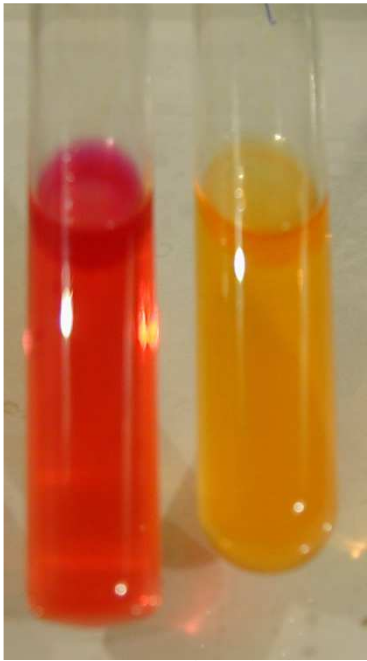
A táptalaj csekély pepton tartalmú; 1% glukózt és bromtimolkék indikátort tartalmaz.

Beoltás: tűvel; a táptalaj aljáig szúrni

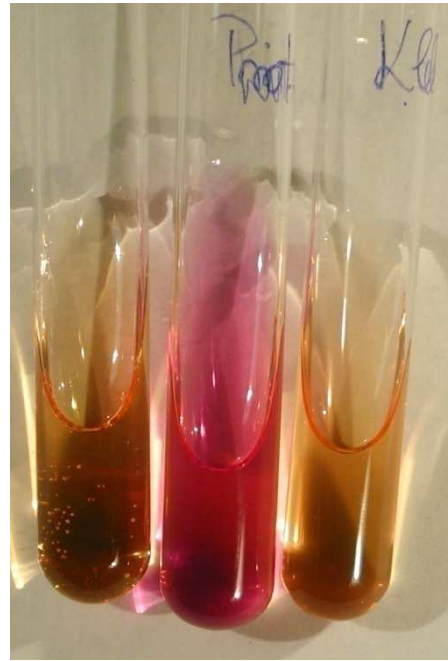
A cső felső része /ill. a le nem zárt cső/ levegőt tartalmaz; az oxidatív bontás csak itt látható (pl: pseudomonas).

Kizárólag a cső alján bontanak: obligát anaerobok.

A cső egész hosszában bontanak: enterobacteriaceae



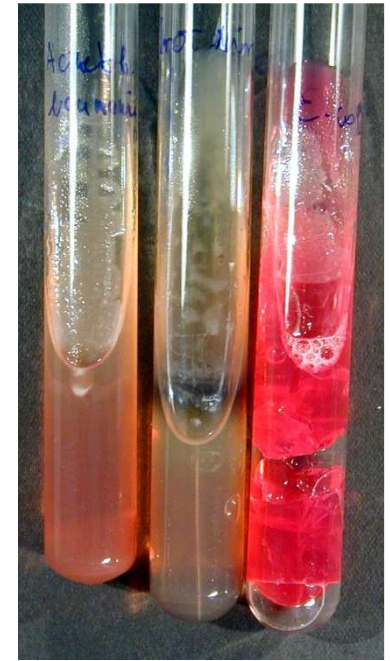
Ureum-indol



Ureum



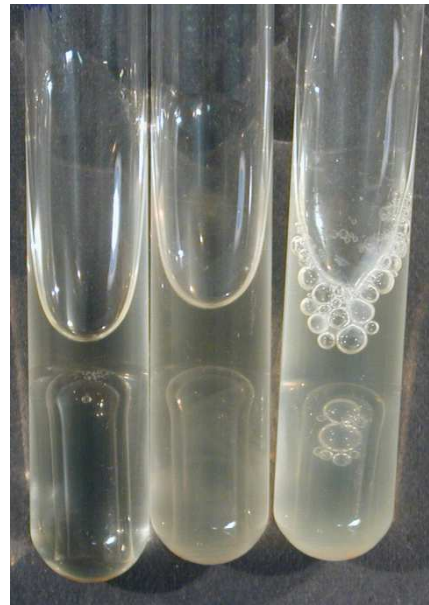
SIM-H₂S



Roussel



OF, NO₃, King-B



NO₃ 2006. 03. 06.



OF

Nitrát redukció I.

- Egyes baktériumok végső elektronakceptorként nem oxigént, hanem nitrogén oxidokat, ill. elemi nitrogént használnak: a nitrátot nitritté, ill. nitrogénné redukálják.
- Vizsgálat: 1% káliumnitrátot tartalmazó táplevesbe oltjuk a baktériumot /a táptalajba a gázképződés kimutatására csövet teszünk/. 24 h-s inkubáció után a Griess-Ilosvay két komponensű reagenst használjuk:
 - „A” oldat: szulfanilsav
 - „B” oldat: alfa-naftilamin ecetsavas oldata

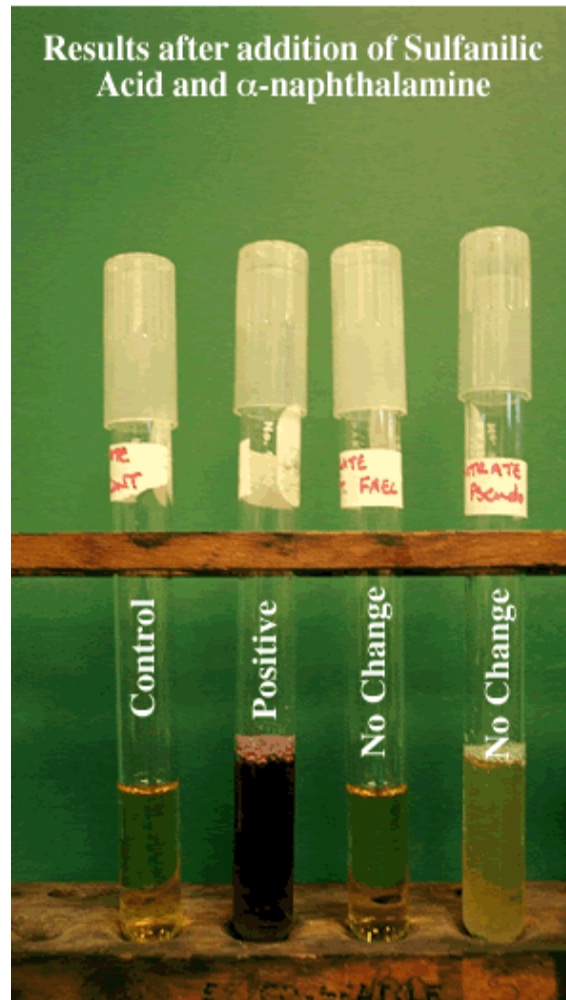
Nitrát redukció II.

- Pozitív /nitrit képződés/: piros elszíneződés (enterobacteriaceae)
- Negatív: nincs színváltozás

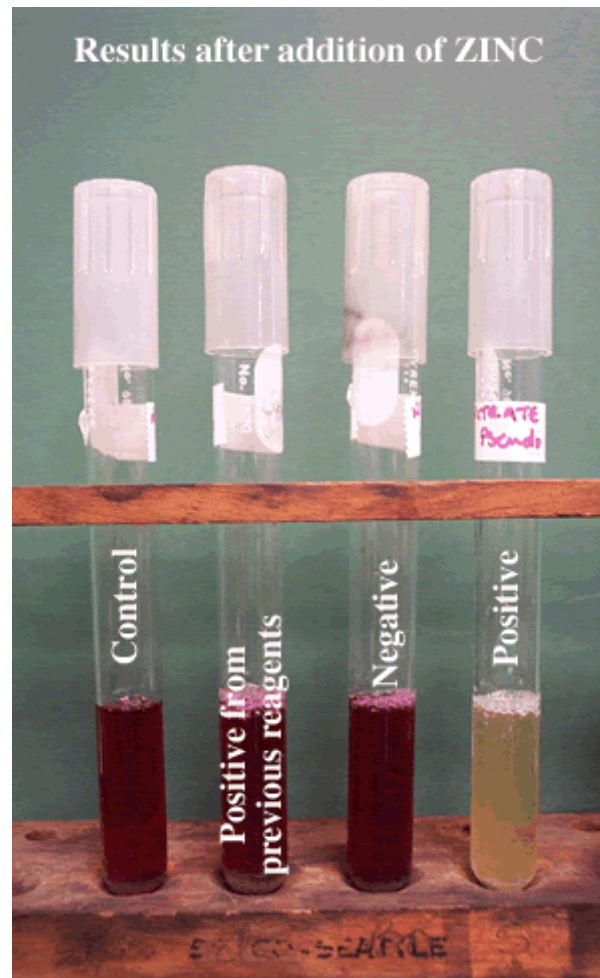
Ha elszíneződést nem tapasztalunk cinkport adunk a táptalajhoz és 45 percig szobahőn állni hagyjuk.

- o Pozitív: a táptalaj színe nem változik - a baktérium a nitrátot nitrogén gázig lebontotta, amely a csőből eltávozott (pl: *Pseudomonas aeruginosa*)
- Negatív: piros elszíneződés (a Zn redukálja a csőben megmaradt nitrátot)

Nitrát reakció értékelése (1)



Nitrát reakció értékelése (2)



Oxidáz próba I.

A baktériumok légzési láncában fontos szerepet játszó citokrom oxidáz enzim kimutatásán alapszik.

A terminális oxidáció során a NADH-ról a hidrogén protonok és elektronok formájában kerül a terminális oxidációs láncba. Vas tartalmú citokromok adják át egymásnak az elektronokat; az utolsó citokrom C redukálódik és a citokrom oxidáz enzim adja át elektronjait az oxigénnek; a citokrom C-t ugyanakkor visszaoxidálja. Az oxigén NADH protonjaival vízzé, vagy hidrogén-peroxiddá egyesül.

A reakcióval nem magát az enzimet mutatjuk ki, hanem a jelenlétére indirekt módon következtetünk. A parafeniléndiamin származékok az oxidációs láncban a citokrom oxidáz helyére lépnek és irreverzibilis reakcióban színes terméké oxidálódnak.

Oxidáz próba II.

Vizsgálat végzése: szűrőpapíron

Reagens elkészítése: 10 mikrogramm PFD-t feloldunk 1 ml desztillált vízben; felhasználás előtt 20-30 percig állni hagyjuk. A baktériumokat üveg tárggyal visszük fel; színezék mentes táptalajról

Pozitív reakció: piros elszíneződés

Reagens tárolása: hűvös helyen 2-3 napig tárolható



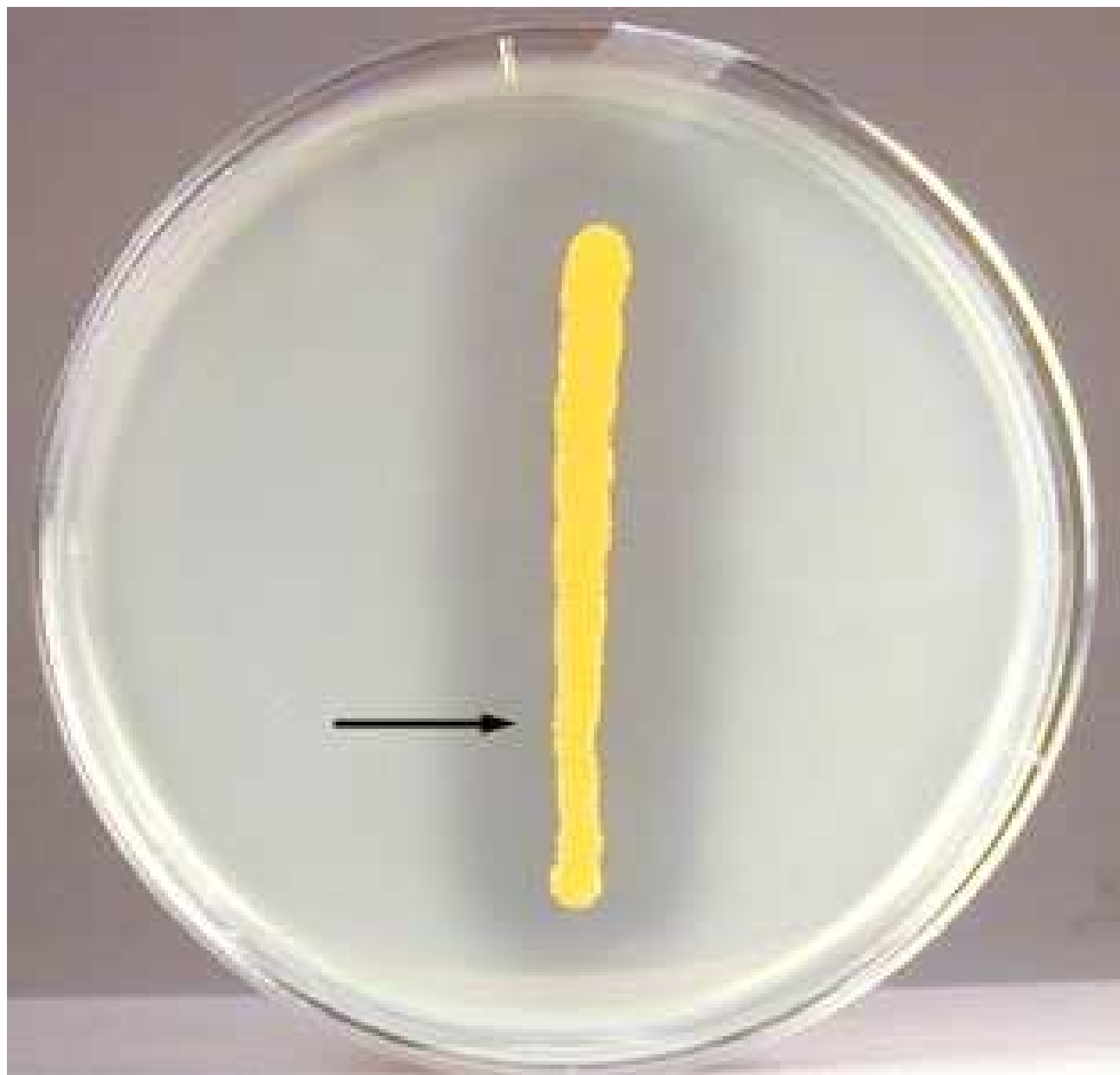
Desoxiribonukleáz próba

A desoxiribonukleáz DNS-t bontó extracelluláris enzim.

Kimutatás: DNS tartalmú szilárd táptalajon
Két napos inkubáció után a telepekre 1 N sósavat
öntünk; a sósav a DNS-t kicsapja; ahol elbomlott, a
telepek körül feltisztult terület látható.

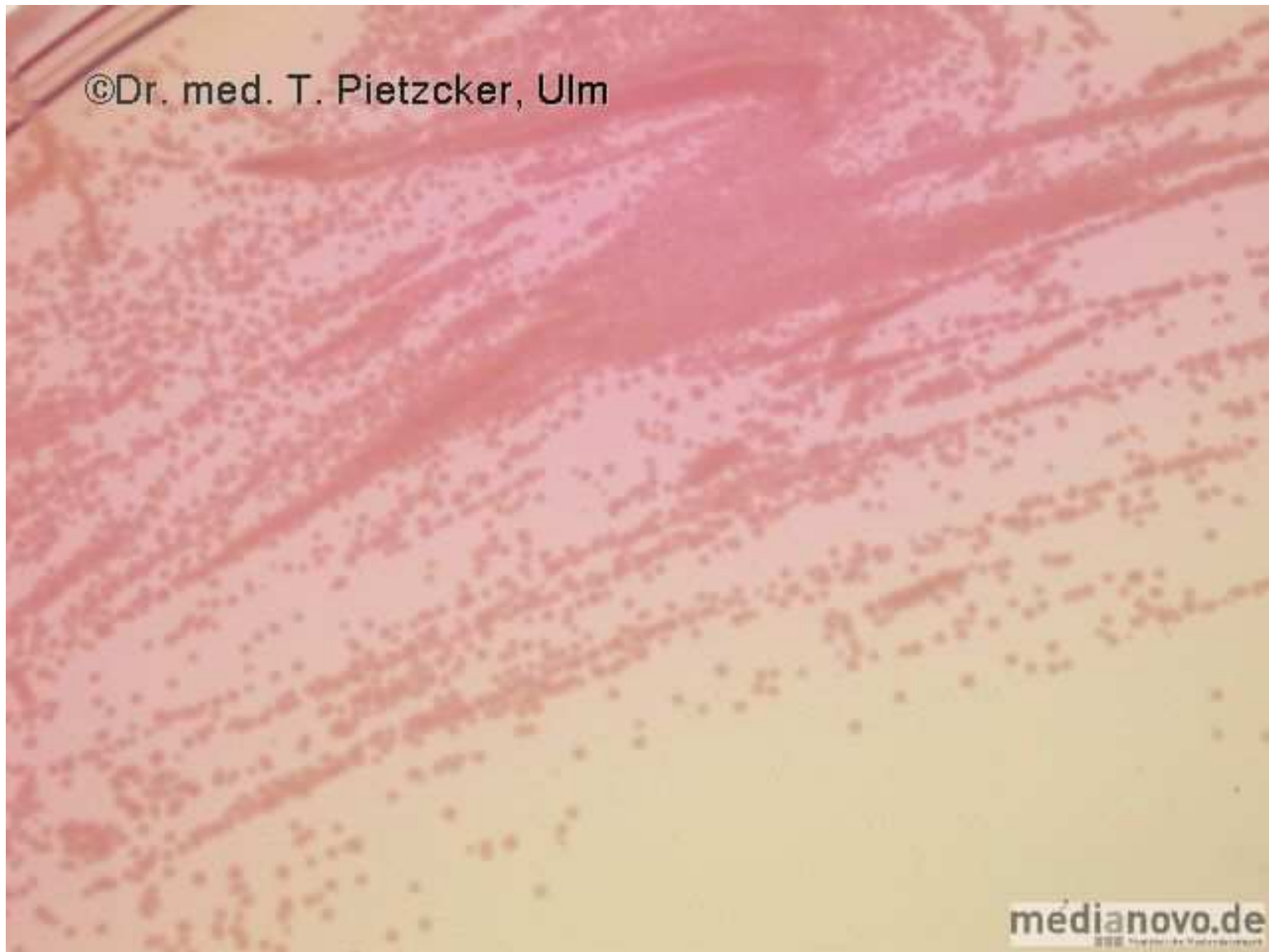
Használatos:

- serratiaknál
- pseudomonasoknál
- staphylococcusoknál
- moraxelláknál



DN-áz próba

2006. 03. 06.



©Dr. med. T. Pietzcker, Ulm

medianovo.de
100 Jahre Medizin

B. cepacia

www.uni-ulm.de

