

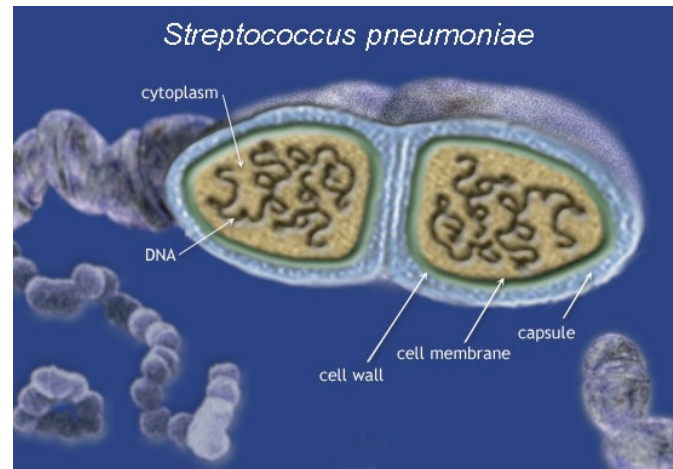
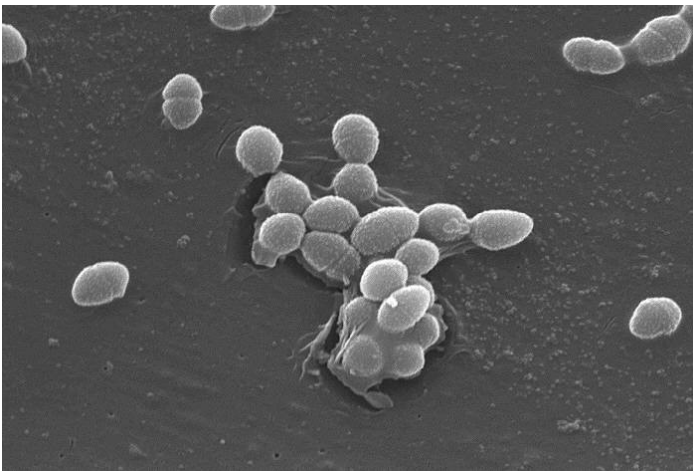
Gram pozitivní aerobní a fakultativně anaerobní bakterie

Ivana Vítková
Masarykova univerzita
Katedra laboratorních metod



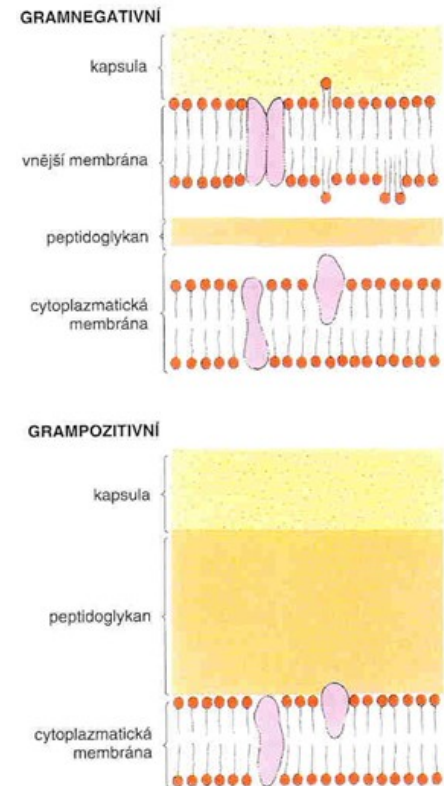
Gram pozitivní koky - charakteristika

- **Koky:** kulovitý tvar, velikost v průměru 1μ
- **Uspořádání:** dvojice (diplokoky), řetízky, tetrády, shluky



Grampozitivní koky - charakteristika

- Barvitelnost dle Grama: dělení bakterií podle schopnosti podržet si barvivo v přítomnosti alkoholu, dáno složením bakteriální stěny
- Bakterie: Gram pozitivní
Gram negativní

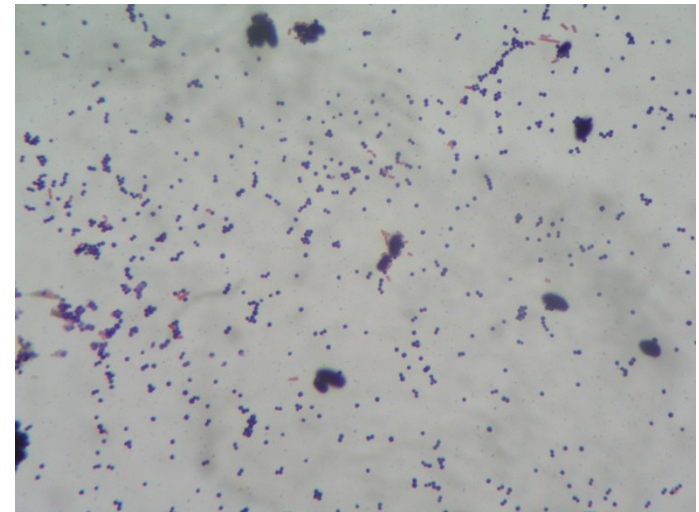


Gram pozitivní koky - rozdělení

- Katalasapozitivní: *Staphylococcus*
Micrococcus
- Katalasanegativní: *Streptococcus*
Enterococcus
Lactococcus
Abiotrophia
Granulicatella

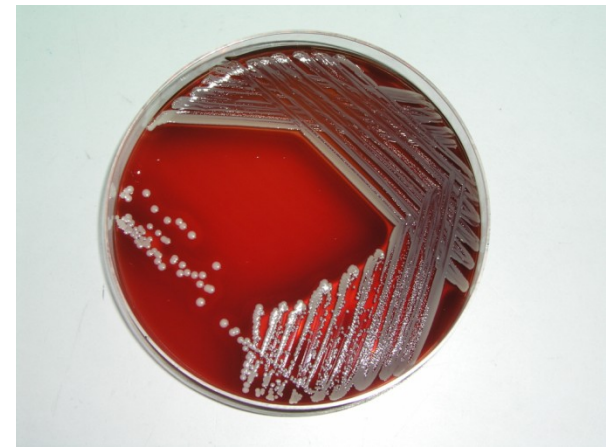
Staphylococcus

- Grampozitivní koky uspořádané nejčastěji ve shlucích
- Nepohyblivé
- Netvoří spory
- Většinou fakultativně anaerobní
- Katalasapozitivní



Staphylococcus

- Celkem přes 50 různých stafylokoků
- Dělení: podle schopnosti koagulovat plazmu
- Koagulasapozitivní: *S. aureus* (STAU)
S. intermedius
- Koagulasanegativní (KNS)



Staphylococcus aureus

- **Nejdůležitější lidský patogen**
- Vůdčí původce nozokomiálních infekcí
- Vysoká schopnost vyvolávat infekce
- Vysoká schopnost kolonizovat (30% populace jsou perzistentní nosiči)
- Aerobní i anaerobní růst, teplota 7-46 C, běžně kolem 36 C

Staphylococcus aureus – faktory virulence

- Umožňující adherenci k buňkám hostitele

plazmakoaguláza – volná koaguláza

shlukovací faktor (clumping faktor)-vázaná koaguláza

kapsulární polysacharidové adheziny

polysacharidové intracelulární adheziny

sliz

Staphylococcus aureus – faktory virulence

- Umožňující pronikání do buněk nebo tkání hostitele

α -hemolyzin

β -hemolyzin (fosfolipáza c)

γ -hemolyzin

δ -hemolyzin

nukleázy, fosfatáza

hyaluronidáza, elastáza

Pantonův-Valentinův leukocidin (PVL)

Staphylococcus aureus – faktory virulence

- Umožňující protiútok bakterií proti obranným mechanismům hostitele

enterotoxiny

toxin syndromu toxického šoku 1 (TSST-1)

exfoliantiny

protein A, stafylokináza (fibrinolysin)

lipáza, leukocidiny, proteázy

β -laktamáza, lysostafin, kataláza

Staphylococcus aureus - patogenita

- **1. Pyogenní infekce kůže a jejích adnex**

impetigo, folliculitis, sycosis barbae,
hordeolum, conjunctivitis, furunculus,
carbunculus, mastitis, hidradenitis



impetigo

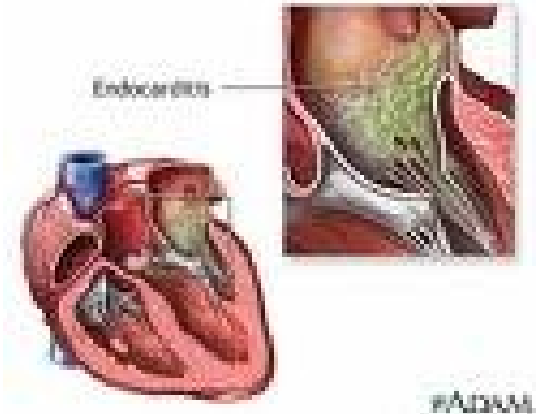
Staphylococcus aureus - patogenita

■ 2. Infekce krevního řečiště

bakteriemie, sepse

infekční endokarditida

tromboflebitida (např. po zavedení i.v.katetru)



■ 3. Respirační infekce

pneumonie v komunitě (např. po chřipkách)

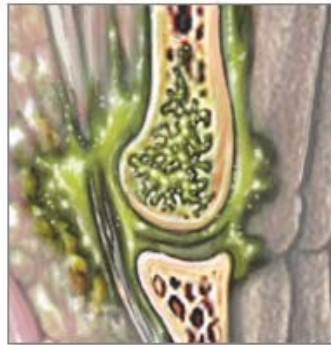
nozokomiální pneumonie (často u pacientů na ventilátorech)

Staphylococcus aureus - patogenita

- 4. Infekce pohybového aparátu
osteomyelitis, arthritis



Bone infection

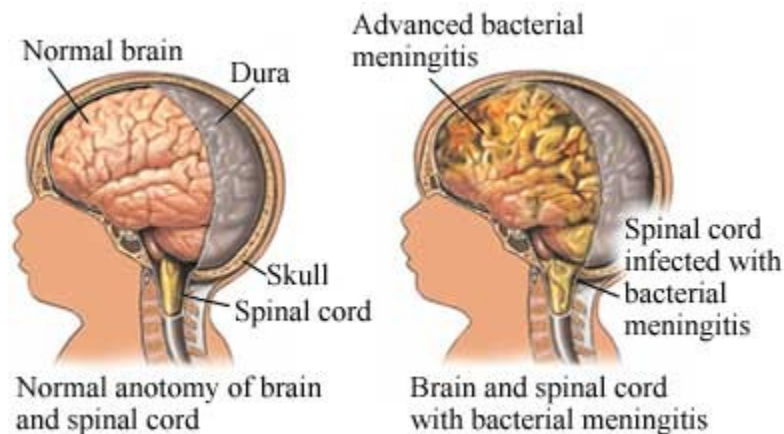


ADAM.



Staphylococcus aureus - patogenita

- **5. Infekce centrálního nervového systému**
purulentní meningitida
mozkový absces



Staphylococcus aureus - patogenita

- 6. Onemocnění vzniklá účinkem toxinů

Syndrom toxického šoku

Stafylokokové enterotoxikózy

Lyellův syndrom

Pemphigus neonatorum

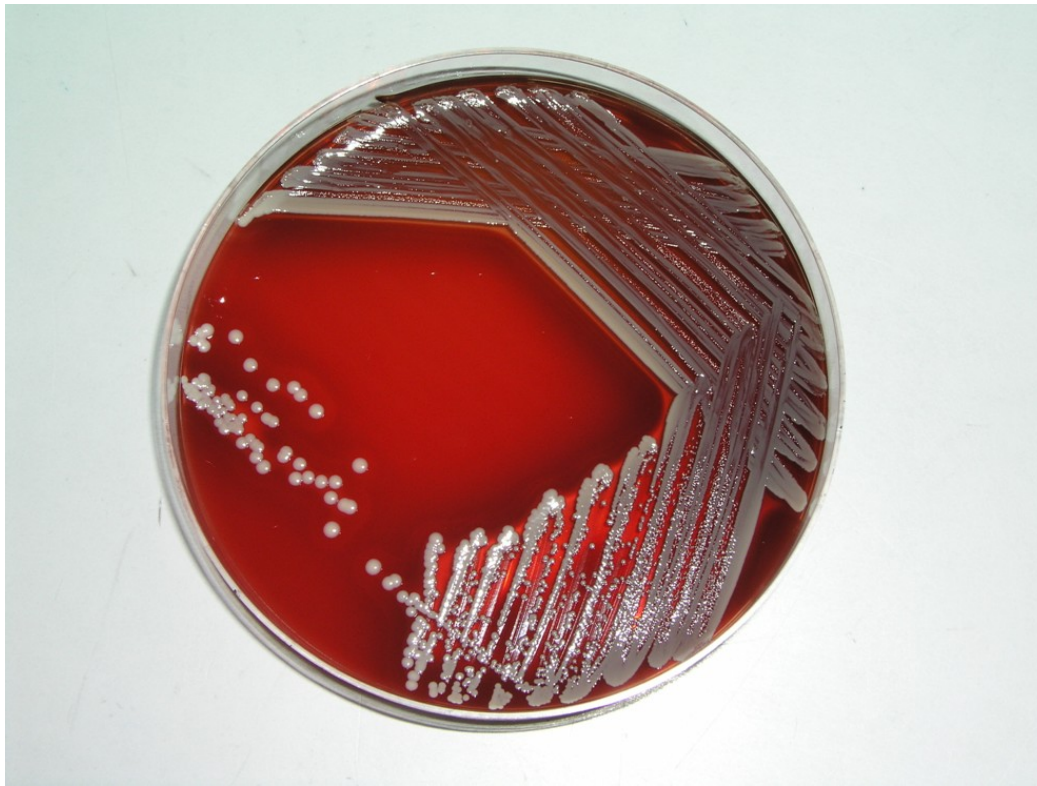


Staphylococcus aureus - laboratorní průkaz

- **Materiály k vyšetření:** hemokultura, hnis, sputum, punktáty, moč,..
- **Mikroskopie:** Gram pozitivní koky ve shlucích
- **Kultivace:** půdy obohacené krví -např. krevní agar, BHI (mozkosrdcový) bujón, selektivní půda – krevní agar s 10% NaCl)
kolonie bílé až žluté se zónou hemolýzy

Staphylococcus aureus

- **Morfologie:** pigmentované hladké kolonie, nejčastěji smetanové či žluté barvy, velikosti 1 až 3mm za 24 hodin kultivace, zóna beta-hemolýzy



Staphylococcus aureus – laboratorní průkaz

- Průkaz hyaluronidázy : dekapulace mukózního kmene *Streptococcus equi*
- Latexová aglutinace: detekce proteinu A i kapsulárních polysacharidů
- MALDI TOF
- Biochemie
- Průkaz volné koagulázy
- Průkaz nukleových kyselin – přímo z materiálu
- Průkaz toxinů: aglutinace, PCR

Staphylococcus aureus methicilin rezistentní (MRSA)

- Závažný nozokomiální patogen
- Nutné dodržování speciálního hygienickoepidemiologického režimu
- V laboratoři je potřeba používat speciální selektivní půdy
- Rezistentní k oxacilinu, často i dalším antibiotikům
- Léčíme jen infekce, ne kolonizace
- Lék volby je vankomycin

Staphylococcus aureus - terapie

- Antibiotika: lék volby je oxacilin
- MRSA: vankomycin

- *Staphylococcus intermedius*

Hostitel pes, u člověka v ranách po

pokousáním psem

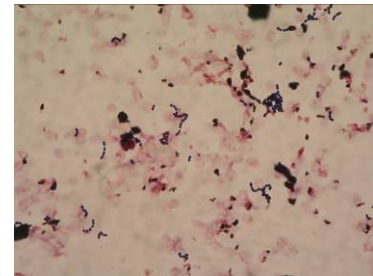


Stafylokoky koagulasanegativní (SKN)

- **Význam:** součást běžné flóry kůže a sliznic
oportunní patogen (ohrožení:
imunokompromitovaní pacienti, pacienti se zavedenými
pomůckami- např. katetry, cévní protézy, i.v. narkomani)
- Schopnost tvorby **biofilmu**, malá virulence, často stačí pouhé
vyjmutí katetru

Streptococcus

- Gram pozitivní koky
- Uspořádané nejčastěji ve dvojicích, v řetězcích
- Fakultativně anaerobní
- Katalasa negativní
- Nepohyblivé
- Druhy obligátně patogenní, jiné součástí běžné flóry



Streptococcus - rozdělení

- **Beta-hemolytické - nejvýznamnější:**

Streptococcus pyogenes (skupina A podle Lancefieldové)

Streptococcus agalactiae (skupina B)

- **Non-beta hemolytické - nejvýznamnější:**

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus bovis,

Streptococcus suis

Nutriční varianty streptokoků

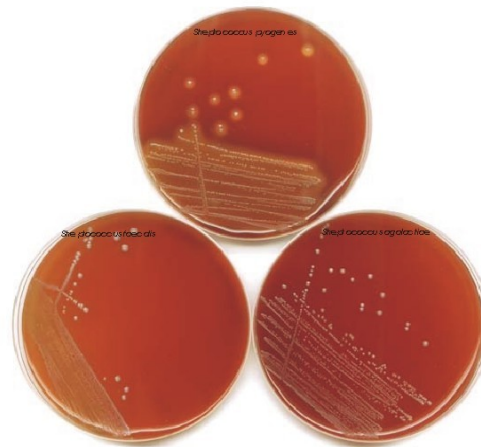
Orální (ústní) streptokoky

Streptococcus pyogenes

- **Význam:** hnisavé infekce faryngu a kůže
těžká celková onemocnění
možný vznik pozdních následků
- **Morfologie:** kulaté koky ve dvojicích a řetízcích
velikost 0,6 až 1 μ m
- **Kultivace :** půdy obohacené krví či sérem – krevní agar,
BHI bujón, zvýšená tenze CO₂, 36-37 C, 18-24 hod.

Streptococcus pyogenes

- Kolonie drobné, lesklé, kolem zóna beta-hemolýzy, opouzdřené kmeny- růst ve větších mukózních koloniích



Streptococcus pyogenes – faktory virulence

- **Povrchové:** protein M, proteiny blízké proteinu M
pouzdro z kyseliny hyaluronové
- **Extracelulární enzymy:** streptolysin O, S
streptokinasa, hyaluronidasa
enolasa, C5 peptidasa
- **Toxiny:** streptokokové pyrogenní toxiny (Spe)

Streptococcus pyogenes - patogenita

- 1. Lokalizované pyogenní infekce
tonsillitis (angína), scarlatina (spála)



Streptococcus pyogenes - patogenita

- Lokalizované infekce –pyodermie

impetigo, erysipelas (růže), cellulitis (zánět podkoží),
hnisání ran



Streptococcus pyogenes - patogenita

■ 2. Invazivní onemocnění a onemocnění způsobená toxiny

phlegmona, myositis,

myonecrosis

nekrotizující fasciitis

pneumonie, meningitis

poporodní sepse (horečka omladnic)

syndrom streptokokového toxického šoku



These large, dark, boil-like blisters are a diagnostic symptom of necrotizing fasciitis (also known as flesh-eating disease).
(Source: EMBBS, 1998 <http://mdchoice.com/>)

Streptococcus pyogenes - patogenita

- 3. Pozdní následky streptokokových onemocnění

febris rheumatica (revmatická horečka)

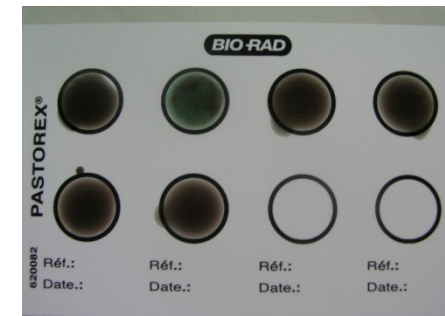
glomerulonephritis acuta

neurologické – chorea minor



Streptococcus pyogenes – laboratorní průkaz

- **Materiály k vyšetření:** výtěr z mandlí, rány, hemokultura, hnis, sputum, punktáty, likvor,..
- **Mikroskopie:** Gram pozitivní koky ve dvojicích, řetězcích
- **Kultivace:** krevní agar, BHI (mozkosrdcový) bujón, 18-24 hod., CO₂ termostat
drobné kolonie se zónou beta-hemolýzy
- Latexová aglutinace , MALDI TOF
- ASLO (antistreptolysin O)- pozdní následky



Streptococcus pyogenes - terapie

- Lék volby: **penicilin**
 - makrolidy (u alergických na PEN)
 - cefalosporiny I. a II. Generace
- Příčiny „selhání léčby“: nejčastěji **nedodržení intervalu podávání antibiotika,**

Streptococcus agalactiae

- **Význam:** nejdůležitější původce novorozeneckých meningitid a sepsí

POZOR na kolonizaci pochvy
těhotných žen!

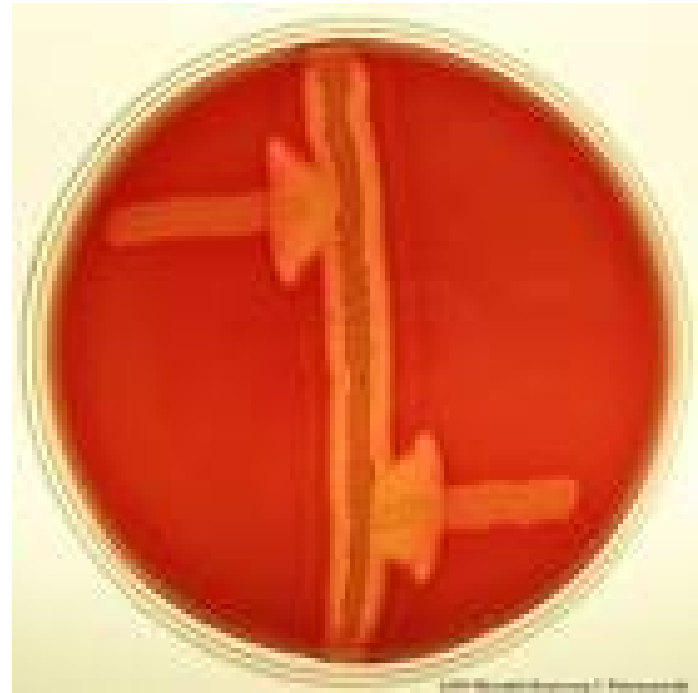
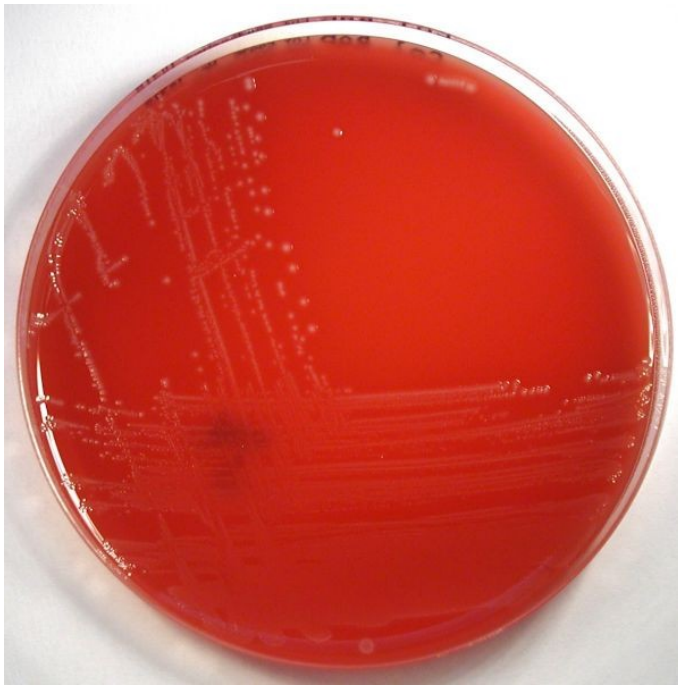
- **Morfologie:** G+ koky v řetízcích

- **Kultivace:** krevní agar, BHI bujón, teplota 36-37 C, zvýšená tenze CO₂, 18-24 hod.



Streptococcus agalactiae

- Kolonie na krevním agaru: obklopené úzkou zónou beta-hemolýzy, zesílení hemolýzy v sousedství *Staphylococcus aureus* díky CAMP-faktoru



Streptococcus agalactiae - patogenita

- 1. Novorozenecké meningitidy a sepse
 - **časné infekce:** vznik během průchodu porodním kanálem, projeví se během několika dní po narození
 - **pozdní infekce:** dítě se nakazí až po porodu, projeví se koncem 1. měsíce života
- 2. Komplikace v šestinedělí: endometritidy, infekce močových cest,..

Streptococcus agalactiae – patogenita a terapie

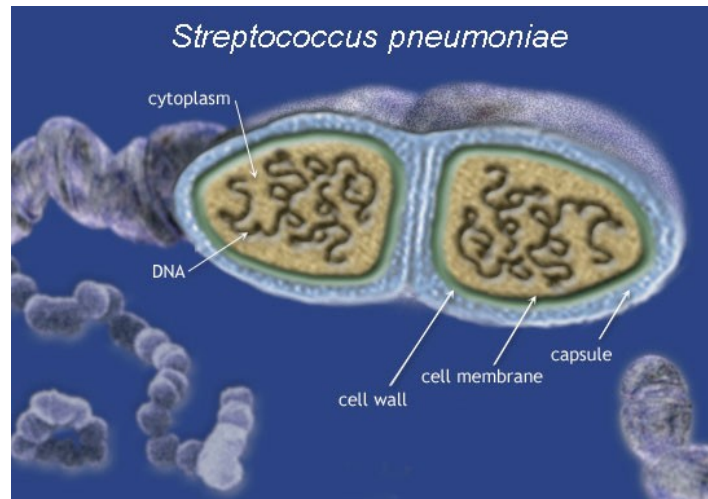
- 3. Onemocnění imunokompromitovaných pacientů
 - pneumonie
 - meningitidy
 - osteomyelitidy
 - infekce ran
- **Terapie:** ampicilin, penicilin

Streptococcus agalactiae – laboratorní průkaz

- **Materiály k vyšetření:** krev, likvor, hnis, punktáty, moč,..výtěr z vagíny –screening u těhotných
- **Mikroskopie:** G+ koky v řetízcích
- **Kultivace:** Krevní agar, zvýšená tenze CO₂, 36-37 C, 18-24 ho
- Pozitivní CAMP test, MALDI TOF
- Latexová aglutinace - z narostlé kultury
- Průkaz nukleových kyselin - PCR

Streptococcus pneumoniae

- Význam: nejčastější bakteriální původce závažných komunitních pneumonií
- Morfologie: G+ koky ve dvojicích s nebarvícím se pouzdrém



Streptococcus pneumoniae

- **Kultivace:** půdy obohacené krví či sérem, teplota 36-37 °C, zvýšená tenze CO₂
- **Morfologie kolonií na krevním agaru:**
 - hlenovité kolonie (mukózní -M fáze)
 - miskovité kolonie
 - suché kolonie (při snížené tvorbě pouzderného polysacharidu)

kolonie obklopené zónou alfa-hemolýzy

Streptococcus pneumoniae
mukózní kolonie na krevním agaru



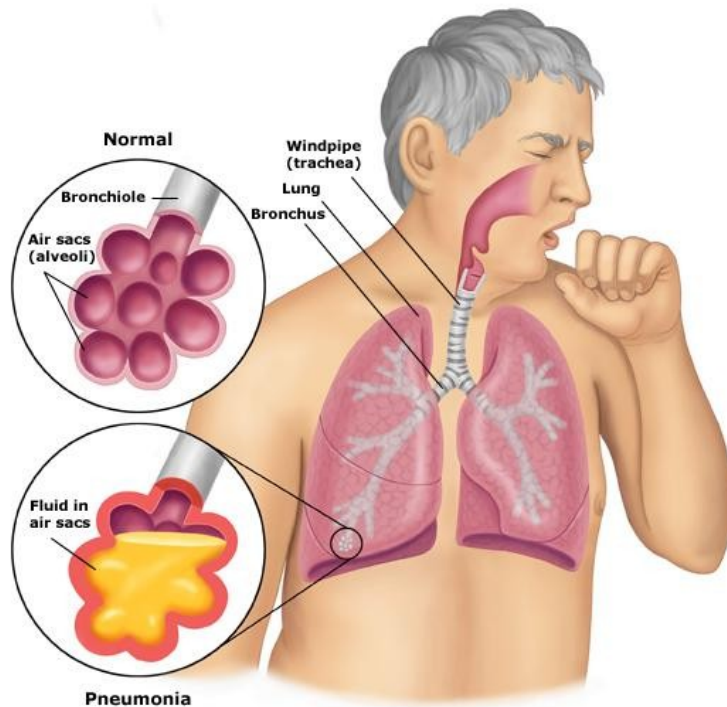
ASM MicrobeLibrary.org © Buxton

Streptococcus pneumoniae – faktory virulence

- Polysacharidové pouzdro (ochrana před fagocytózou)
- Adheziny: povrchový adhezin A
povrchový protein C
- Invaziny: hyaluronidasa
neuraminidasa
- Pneumolyzin
- Autolyzin, polysacharid C

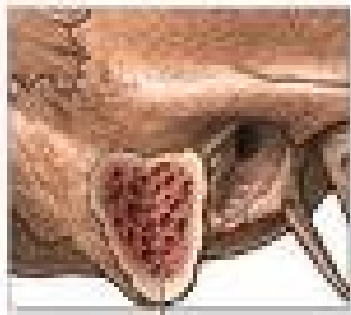
Streptococcus pneumoniae - patogenita

- 1. Komunitní pneumonie (ohroženi zvláště kojenci a starší dospělí)



Streptococcus pneumoniae - patogenita

- 2. Rhinitis purulenta (zánět nosní sliznice)
Otitis media (zánět středního ucha)
Mastoiditis (zánět bradavčitého výběžku)
Sinusitis (zánět vedlejších nosních dutin)
- 3. Purulentní meningitis (starší dospělí, malé děti)



Infection of mastoid
air cells (mastoiditis)



Streptococcus pneumoniae – patogenita a terapie

- 4. Akutní endokarditida (zánět nitroblány srdeční)
- 5. Peritonitida
- 6. Sepse u asplenie (pacienti bez sleziny)
- 7. Arthritida (zánět kloubů)

- **Terapie:** lék volby **penicilin**
ampicilin, cefotaxim, chloramfenikol

- **Prevence:** vakcinace (malé děti, oslabení dospělí)

Streptococcus pneumoniae – laboratorní průkaz

- **Materiál k vyšetření:** sputum, krev, punktáty, likvor, moč k průkazu antigenu,...
- **Mikroskopie:** G+ koky ve dvojicích, pouzdro, lancetovitý tvar koků
- **Kultivace:** krevní agar, zvýšená tenze CO₂, 18-24 hod., typická morfolgie kolonií
- **Optochinový test:** kolem disku s optochinem vzniká zóna inhibice růstu

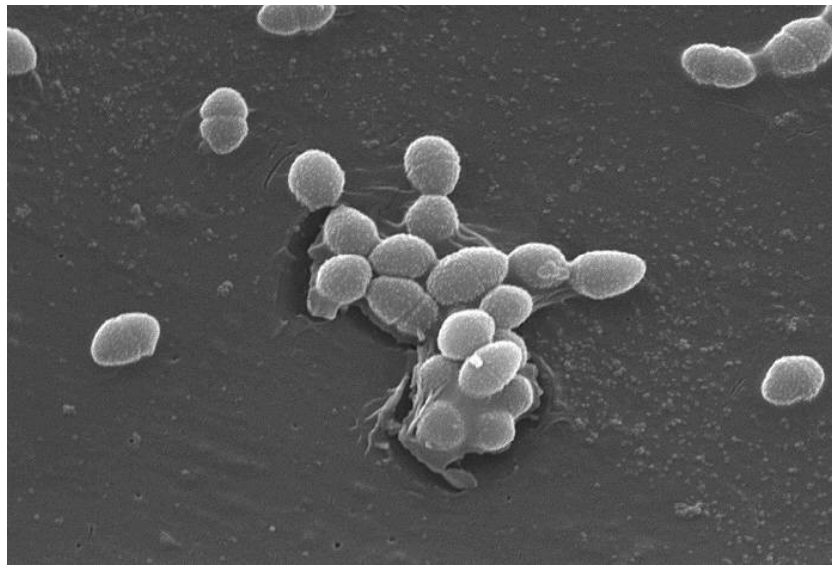


Streptococcus pneumoniae – laboratorní průkaz

- Průkaz antigenů: latexová aglutinace
 - z narostlé kultury
 - imunochromatograficky přímo z materiálu – likvor, moč
- Biochemie
 - Test rozpustnosti ve žluči
- Průkaz nukleových kyselin - PCR

Enterococcus

- **Význam:** součást normální mikroflóry střeva
závažný podmíněný nemocniční patogen
- **Morfologie:** G+ koky ve dvojicích či krátkých řetězcích
- **Více klinicky významných druhů:** nejčastější
Enterococcus faecalis, *Enterococcus faecium*



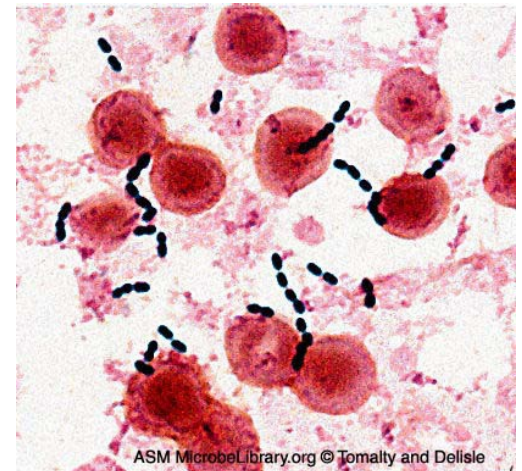
Enterococcus

- **Kultivace:** kultivačně nenáročné, krevní agar, selektivní půdy (např. Slanetz-Bartleyho půda), 36-37 C, 18-24 hod.
- **Patogenita:** infekce močových cest

infekce nitrobřišní

sepsy u oslabených pacientů

endokarditida



Enterococcus – laboratorní diagnostika

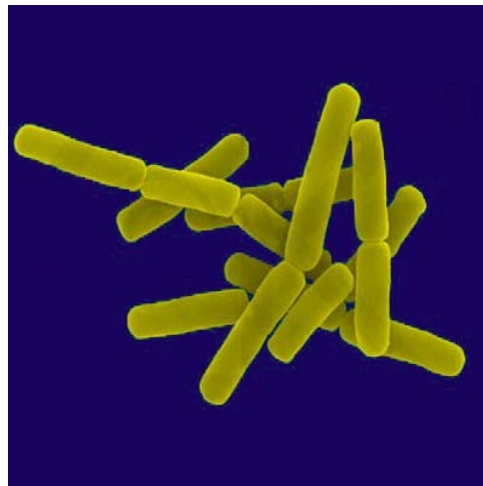
- Materiály k vyšetření: moč, krev, hnis, punktáty,..
- Mikroskopie: G+koky ve dvojicích
- Kultivace: viz výše, selektivní půdy na vankomycin rezistentní enterokoky, žluč-eskulinové půdy
- PYR test: průkaz pyrolidonylaminopeptidasy
- Biochemické testy, MALDI TOF, PCR

Enterococcus - terapie

- Přirozená rezistence enterokoků závislá na druhu
- Používaná antibiotika: **ampicilin**
 - furantoin (moč. infekce)
 - vankomycin, ...
- Pozor na **nemocniční kmeny rezistentní na vankomycin (VRE)**

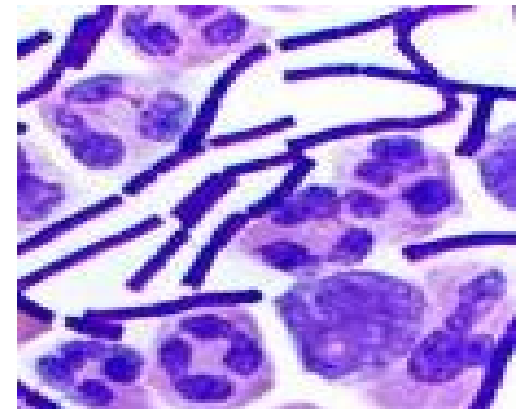
Gram pozitivní sporulující aerobní tyčinky – rod *Bacillus*

- V přírodě běžně rozšířené
- Ke sporulaci dochází pouze za přítomnost kyslíku
- Patří sem více druhů, některé z nich jsou obligátní lidské patogeny (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*)



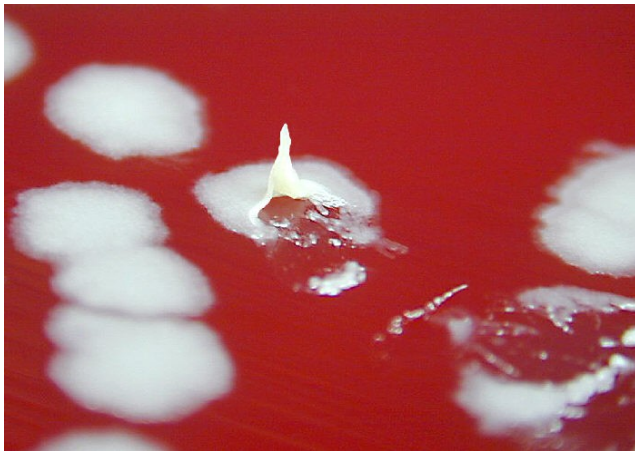
Bacillus anthracis

- **Význam:** původce sněti slezinné (antraxu),
možné zneužití – bioterorismus
- Z nakažených zvířat - býložravci – snadný přenos na člověka, - možnost přenosu kontaktem -dobyččí kůže, štětiny,..
- Možnost nákazy vdechnutím spor (biologická válka, spory v dopisech, sekta Óm Šin Rikjo)
- **Morfologie:** velké nepohyblivé G+ tyčky s pozdrem, spory centrálně uložené
- **Kultivace:** běžné kultivační půdy, široké teplotní optimum, běžně 36-37 C



Bacillus anthracis

- Vzhled kolonií: plstnaté ploché šedé kolonie s dlouhými výběžky (caput Medusae)



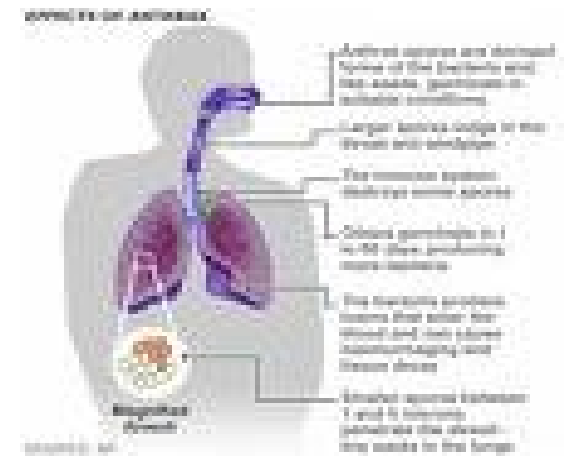
Bacillus anthracis - patogenita

- **Kožní forma:** zpočátku svědící papula, během několika dní se mění na nebolestivý vřed s hemoragickou nekrózou obklopený edémem (pustula maligna), rozvíjí se lymfadenitida, později sepse



Bacillus anthracis - patogenita

- **Plicní forma:** spory jsou vdechnuty, dostávají se do uzlin v mezihrudí, vzniká zde nekrotický zánět, sepse, nemocný umírá během několika hodin až dnů
- **Střevní forma:** po požití kontaminované potravy, zvracení, silné bolesti břicha, sepse, smrt
- **Orofaryngeální forma:** primární léze je na mandlích, nebo v ústní dutině

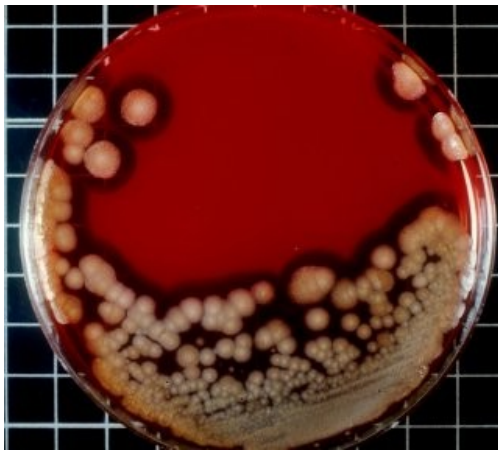


Bacillus anthracis – laboratorní vyšetření

- Běžné diagnostické laboratoře (BL2) neprovádějí diagnostiku, při podezření na *Bacillus anthracis* je materiál transportován ve trojitém obalu do NRL pro anthrax Státního veterinárního ústavu
- Podezření na anthrax: podle klinických příznaků, v laboratoři – typická mikroskopie z klinického materiálu, kultivace – typický vzhled kolonií, dále již v laboratoři BL2 nedourčujeme
- **Terapie:** penicilin, ciprofloxacin
- **Prevence:** vakcinace dobytka, ohrožených obyvatel

Bacillus cereus

- **Význam:** původce závažných infekcí oka a enterotoxikóz, nachází se běžně v zevním prostředí, je součástí střevní mikroflóry
- **Morfologie:** G+ neopouzdrěná tyčka, spóra centrálně
- **Kultivace:** kultivačně nenáročná, běžné kultivační půdy i teploty, kolonie velké, plstnaté, se zónou beta-hemolýzy, lze používat i selektivně diagnostické půdy



Bacillus cereus - patogenita

- Producent řady toxinů: enterotoxiny (emetický a průjemový), hemolyziny, fosfolipasa C
- Enterotoxikóza: po požití kontaminované potravy, podle typu toxinu: **1. vodnatý průjem** a kolika po 6-16 hod. po požití (masné výrobky a omáčky, např. ohříváný guláš)
2. nausea a zvracení vznikající do 5 hod. po požití potravy (těstoviny a rýže)



Bacillus cereus - patogenita

- Endoftalmitida: fulminantně probíhající zánět oka
- Infekce ran, sepse, meningitis, endokarditis
u imunokomprimovaných pacientů



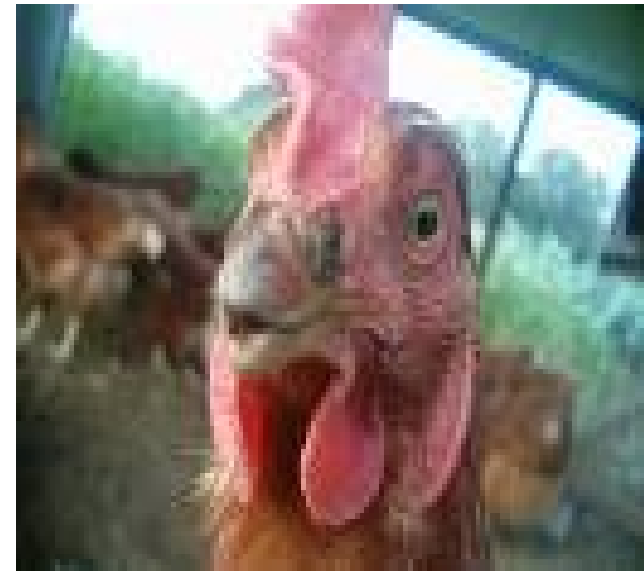
Bacillus cereus – laboratorní diagnostika a terapie

- **Průkaz toxinů** přímo z klinického materiálu či z narostlého kmene: latexová aglutinace, ELISA
- **Mikroskopie:** G+ tyčky s centrálně uloženou spórou
- **Kultivace:** viz výše, typický vzhled kolonií
- **Biochemické testy, MALDI TOF**
- **Terapie:** enterotoxikózy- jen rehydratace
invazivní onemocnění: linkosamidy, aminoglykosidy, vankomycin

Listeria

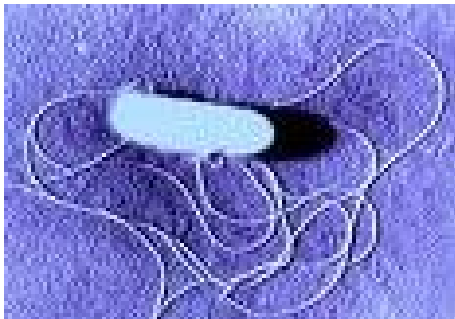
- **Význam:** pro člověka patogenní především *Listeria monocytogenes*, nejčastěji **alimentární nákazy**, ale i **závažná onemocnění imunokompromitovaných pacientů, těhotných žen a novorozenců**

běžně se nachází v zevním prostředí
vektor nákazy: sýry, ..



Listeria

- **Morfologie:** rovná G+ tyčka, pohyblivá při teplotě do 25 °C
- **Kultivace:** kultivačně nenáročná, běžné kultivační půdy i teploty, růst i při chladničkové teplotě a vysoké koncentraci NaCl
- **Faktory virulence:** listeriolysin O, fosfolipazy, internaliny (intracelulární růst)



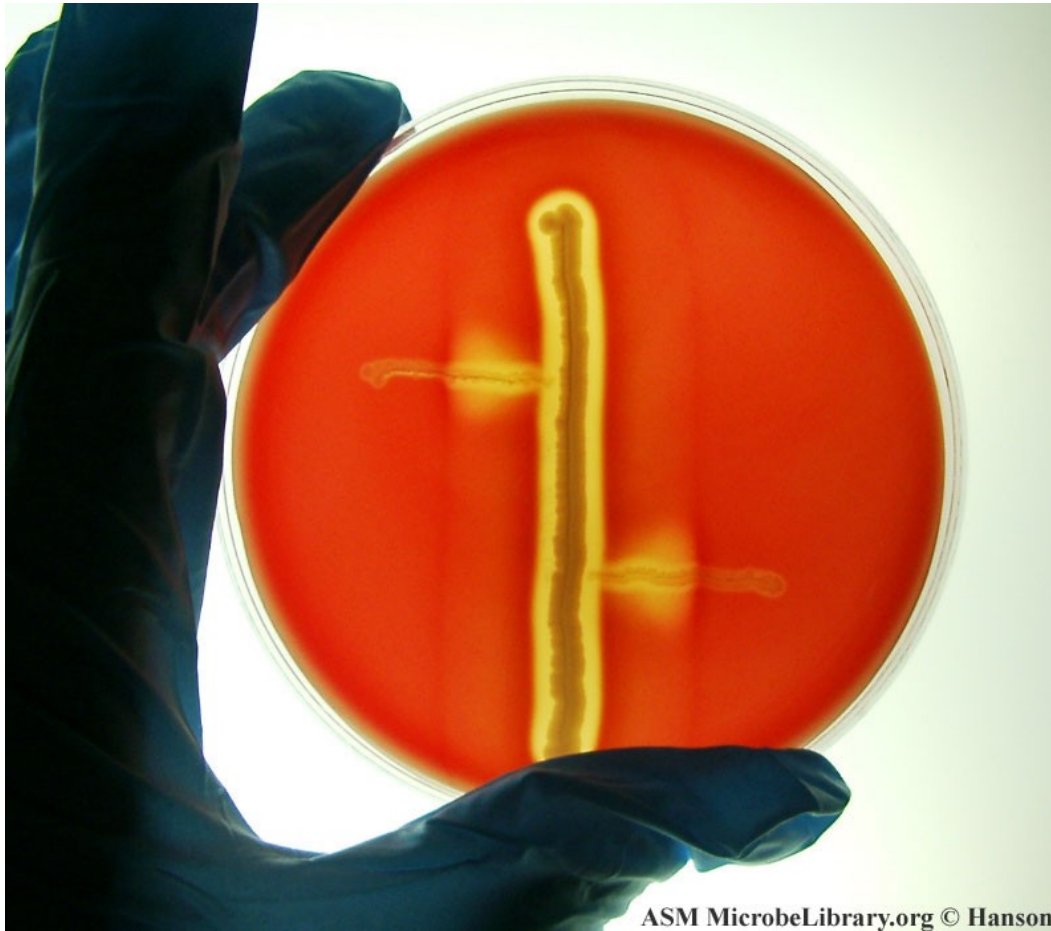
Listeria - patogenita

- **Zdraví lidé** - bezpříznakové onemocnění, **imunokompromitovaní** (novorozenci, HIV+, onkologicky nemocní,..) – meningitidy, sepse, ..
 - **Novorozenci**: infekce získané již v prenatálním období, či po porodu – nejčastěji sepse a meningitidy
- Pozor na stravování během těhotenství**
zrající nepasterizované sýry,....



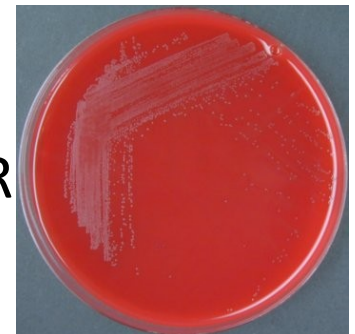
Listeria - terapie

- Léčba: ampicilin v kombinaci s gentamicinem



Erysipelothrix rhusiopathiae

- **Význam:** původce červenky prasat, možný přenos na člověka, ohroženi především řezníci, kuchaři
- **Morfologie:** G+ štíhlé tyčinky, nepohyblivé
- **Kultivace:** půdy obohacené krví či sérem, zvýšená tenze CO₂, široké rozmezí teplot, snáší i chladničkové teploty a vyšší koncentrace NaCl
- **Laboratorní průkaz:**
 - Materiál k vyšetření: stěry z ran, sekrety, krev,..
 - Mikroskopie, kultivace: viz výše, MALDI TOF, PCR



Erysipelothrix rhusiopathiae - patogenita

- Zoonóza, přenos na člověka nejčastěji poraněnou kůží



Erysipelothrix rhusiopathiae – patogenita a terapie

- **Erysipeloid:** nejčastější, lokální kožní léze, bolestivé zarudnutí kůže, bez hnisání, často s artritidou přilehlého kloubu
- **Endokarditida, sepse:** oslabení jedinci (alkoholici)
- **Terapie:** lék volby **penicilin**



Arcanobacterium

- **Význam:** pro člověka patogenní druh **Arcanobacterium haemolyticum**, původce tonsilitid dospívajících, infekcí ran
- **Morfologie:** G + tyčka
- **Kultivace:** obohacené půdy, nutná čára *Staphylococcus aureus*, 48 hod, teplota 36-37 C

Arcanobacterium

- Laboratorní diagnostika:
- Mikroskopie: G+ tyčky.
- Katalasa negativní
- Typický reverzní CAMP test za 48 hodin kultivace



Arcanobacterium

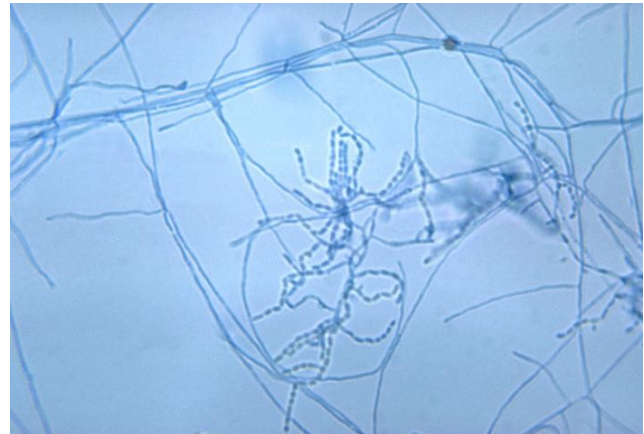
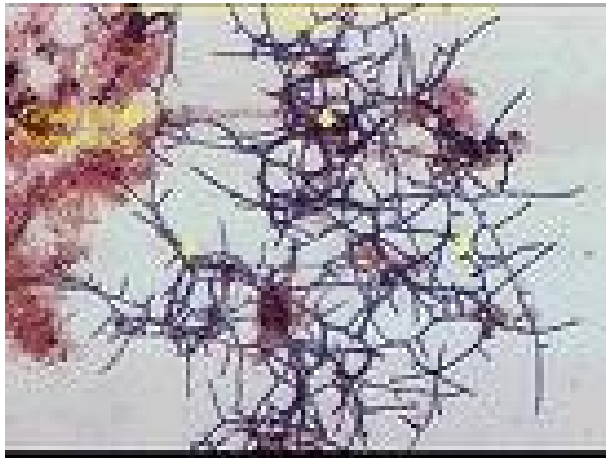


- Patogenita:
- Tonsilitida s vyrážkou, typické pro dospívající a mladé dospělé
- Infekce ran
- **Terapie:** makrolidy



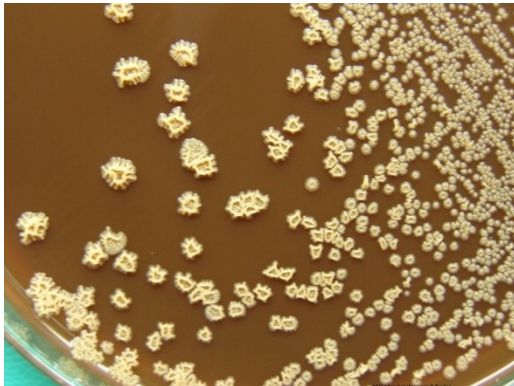
Nocardia

- **Význam:** běžně se nalézají v půdě, infekce plic, mozku, kůže, oka,..- zvláště u imunokompromitovaných pacientů
- **Morfologie:** G+ větvicí se tyčinky až vlákna



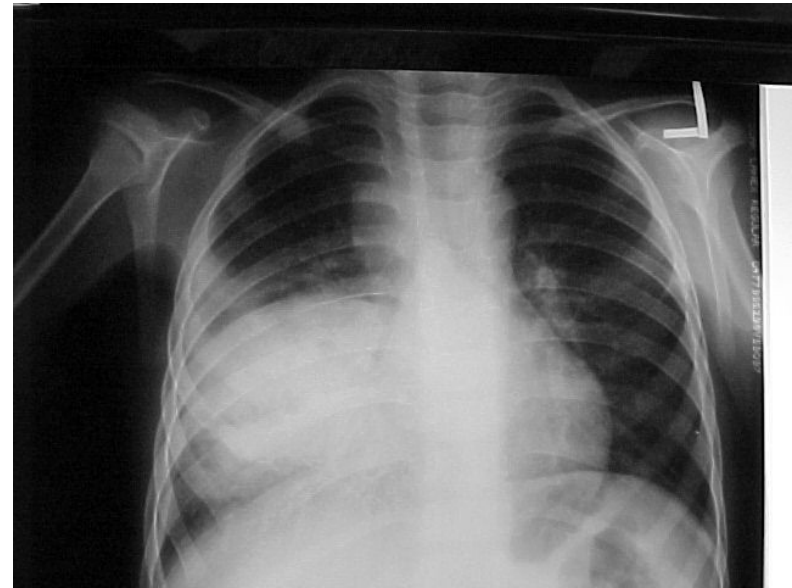
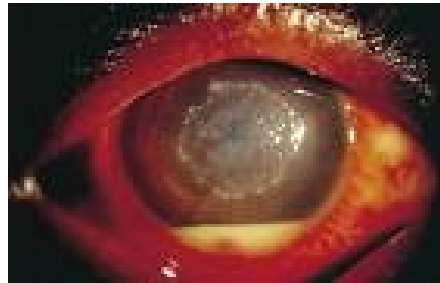
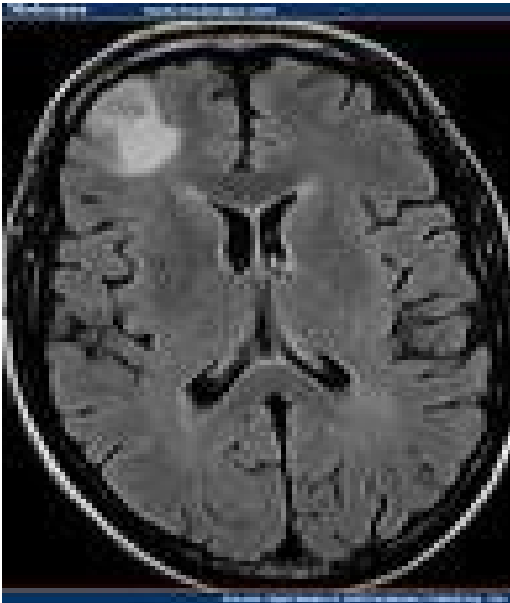
Nocardia

- **Kultivace:** na běžných kultivačních půdách,
- teplota 36-37 C, 2-5 (14) dní
- **Laboratorní diagnostika:**
- Mikroskopie – z materiálu, z kultury
- Kultivace –viz výše, kolonie jsou bílé až oranžové, suché
- MALDI TOF, PCR

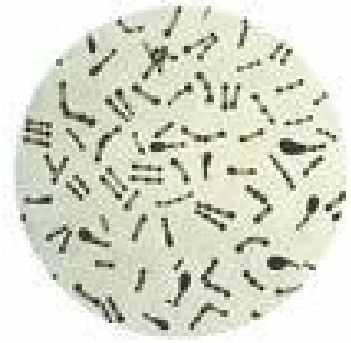
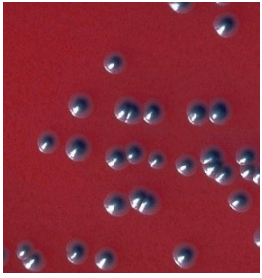


Nocardia – patogenita a terapie

- Ohroženy imunokompromitované osoby
- Abscesy plic, mozku., oka, orgány, kůže
- Terapie: lék volby **kotrimoxazol**



Corynebacterium



- **Význam:** Některé druhy jsou součástí běžné kožní flóry, *Corynebacterium diphtheriae* je původcem záškrtu
- **Morfologie:** G+ tyčky kyjovitého tvaru
- **Kultivace:** půdy obohacené krví, 36-37 C, 18-24 hod., pro *C. diphtheriae*, nutné selektivní půdy (např. Clauberova půda s teluričitanem draselným)
- **Laboratorní průkaz:**
 - **Materiál k vyšetření:** výtěr z krku, nasofaryngu- záškrť, krev, výtěry z ran,..-ostatní korynebakteria.
 - Mikroskopie, kultivace: viz výše, MALDI TOF, PCR, biochemie

Corynebacterium - patogenita

- ***Corynebacterium diphtheriae***: původce záškrtu – projevuje se jako difterická angína, nebo croup (otok laryngu s pevnělnoucími pablánami) – může vést až k udušení, jako komplikace může vzniknout myokarditida, neuropatie
- ***Corynebacterium ulcerans***: infekce ran
- **Ostatní korynebakteria**: součást kožní flóry
- ***Corynebacterium jejkeium***: nosokomiální patogerní infekce ran



Fig. 2. Skin ulcer covered by a yellowish membrane on leg of patient with *Corynebacterium ulcerans* infection.



Corynebacterium

- **Terapie:** lék volby **penicilin**, alternativa makrolidy
- **Prevence:** součástí povinného očkování



Děkuji Vám za pozornost

