

# Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 18:

Přehled anaerobů a mykobakterií

Ondřej Zahradníček 777 031 969

[zahradnicek@fnusa.cz](mailto:zahradnicek@fnusa.cz) ICQ 242-234-100

# Co nás dnes čeká

- Nesporulující anaerobní bakterie
- Klostridia (grampozitivní sporulující anaerobní tyčinky)
- Mykobakteria (původce tuberkulózy, původce lepry, atypická mykobakteria); zmínka o aktinomycetách a nokardiích

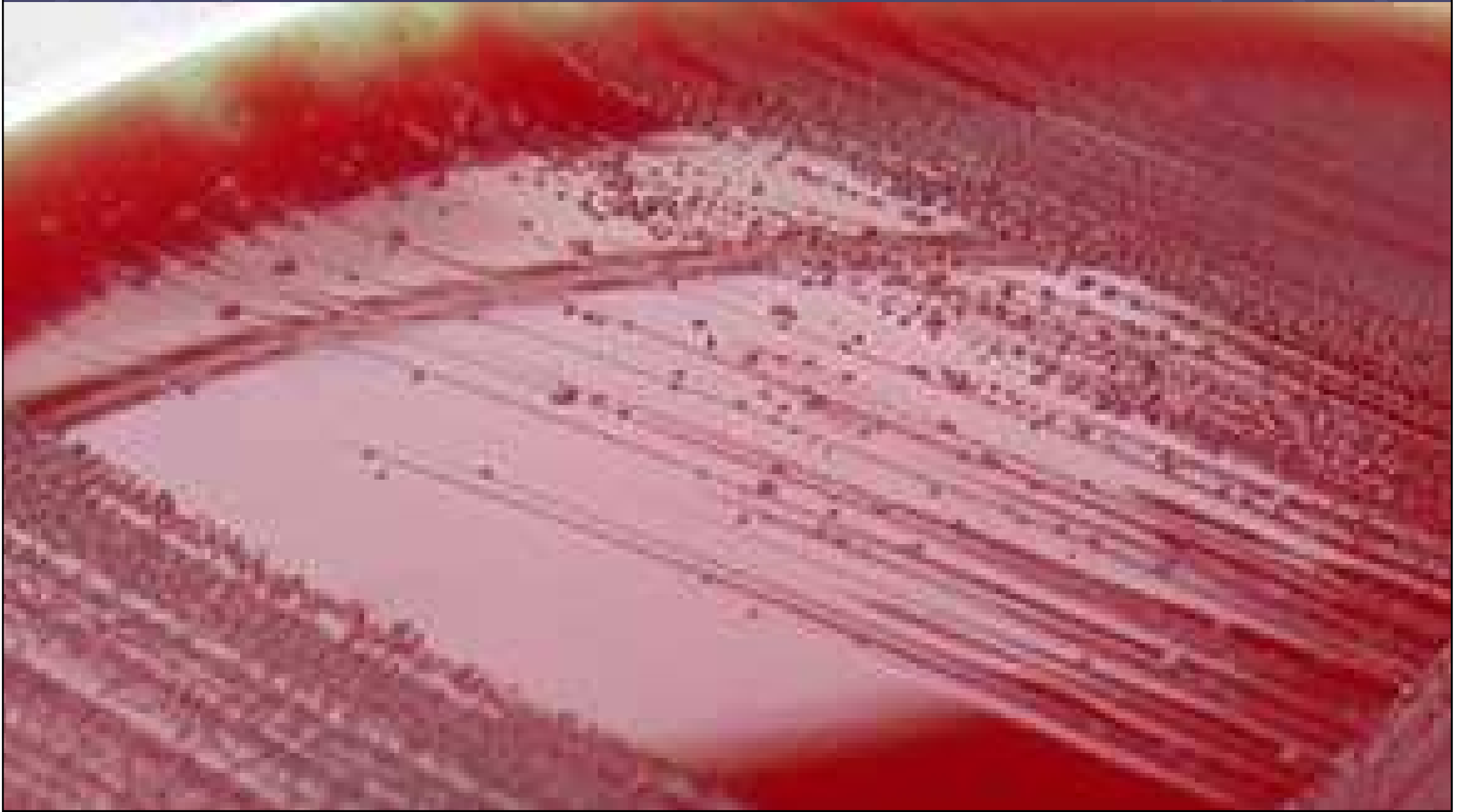
# Ještě než začneme...

- ...měli bychom si cosi uvědomit. Doted' (minulé dvě přednášky) jsme si povídali většinou (až na výjimky, např, kapavku) o bakteriích, které se projeví při běžné diagnostice
- Doktor prostě pošle vzorek „na kultivaci“, a ono z něj „něco vyroste“.
- S tím už je ale **KONEC!** Dál už nás čekají jen mikroby, pro které tohle neplatí.

# Takže:

- Pokud chce klinik, aby byl jeho vzorek prověřen na přítomnost anaerobů, mykobakterií či aktinomycet, musí to uvést na průvodce. Musí se užít speciální postupy.
- U dalších původců (třeba spirochet či chlamydií) se navíc zpravidla odebírá sérum a provádí se nepřímý průkaz
- Laborant si toho musí být vědom a případně upozornit na vhodný způsob odběru či označení průvodky

# 1. Nesporulující anaeroby



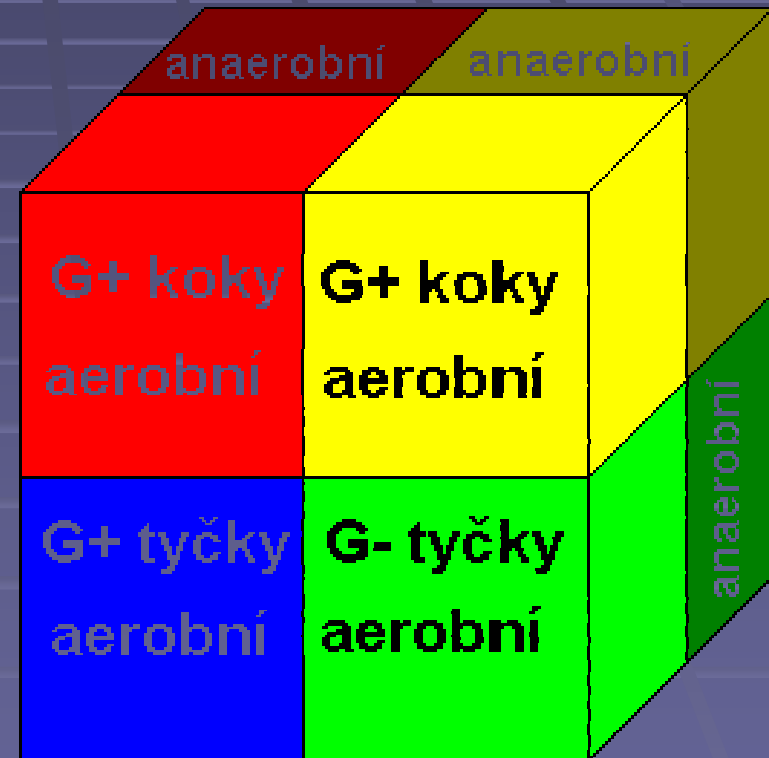
# Co jsme znali doted'

- Zatím jsme se seznámili se čtyřmi skupinami mikrobů, které rostou za aerobních podmínek – ať už jsou striktně aerobní jako např. pseudomonády, nebo fakultativně anaerobní jako třeba *Escherichia coli*.

G+ koky	G- koky
G+ tyčky	G- tyčky

# Nyní si přidáme další čtyři skupiny

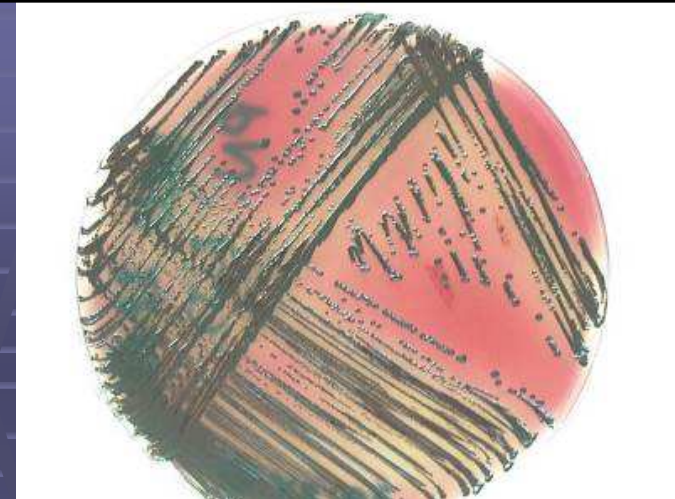
- Každá z oněch čtyř skupin má totiž svoje anaerobní „bratříčky“. Jejich vlastnosti se výrazně liší od aerobních bakterií a naopak vykazují některé společné charakteristiky. Vymyká se jen rod *Clostridium*, protože umí tvořit spory





# Příběh

- Paní Raková byla přijata pro horečnatý stav a intenzivní bolesti břicha
- Zobrazovací metody ukázaly na absces malé pánve. Ukázaly však také nádor na děložním čípku – později se ukázalo že jde o karcinom
- U paní Rakové se naštěstí podařilo operačně vyřešit nejdříve absces a poté i nádor, byť za cenu provedení hysterektomie. Metastázy se naštěstí neobjevily.





# Viníkem je

- Směs striktně anaerobních, ale i fakultativně anaerobních bakterií
- Tato směs se zřejmě vyskytovala v pochvě paní Rakové, aniž by jí činila sebemenší problémy
- Nádor však porušil anatomickou bariéru, a mikroby se dostaly do míst, kde způsobily absces.
- Nesporulující striktně anaerobní mikroby mají vzhledem ke svým vlastnostem velmi omezené možnosti přenosu.
- Velká část infekcí je tedy endogenního původu

# Připomeňme si, za jakých podmínek rostou jaké bakterie

Prostředí	Normální	↓ O <sub>2</sub>	↑ CO <sub>2</sub>	Bez O <sub>2</sub>
Striktní aeroby	ano	ano	ano	ne*
Fakultativ. anaeroby	ano	ano	ano	ano
Aerotolerantní bakt.				
Mikroaerofilní bakt.	ne	ano	(ano)	ne*
Kapnofilní bakterie	ne	(ano)	ano	ne*
Striktní anaeroby	ne	ne	ne	ano**

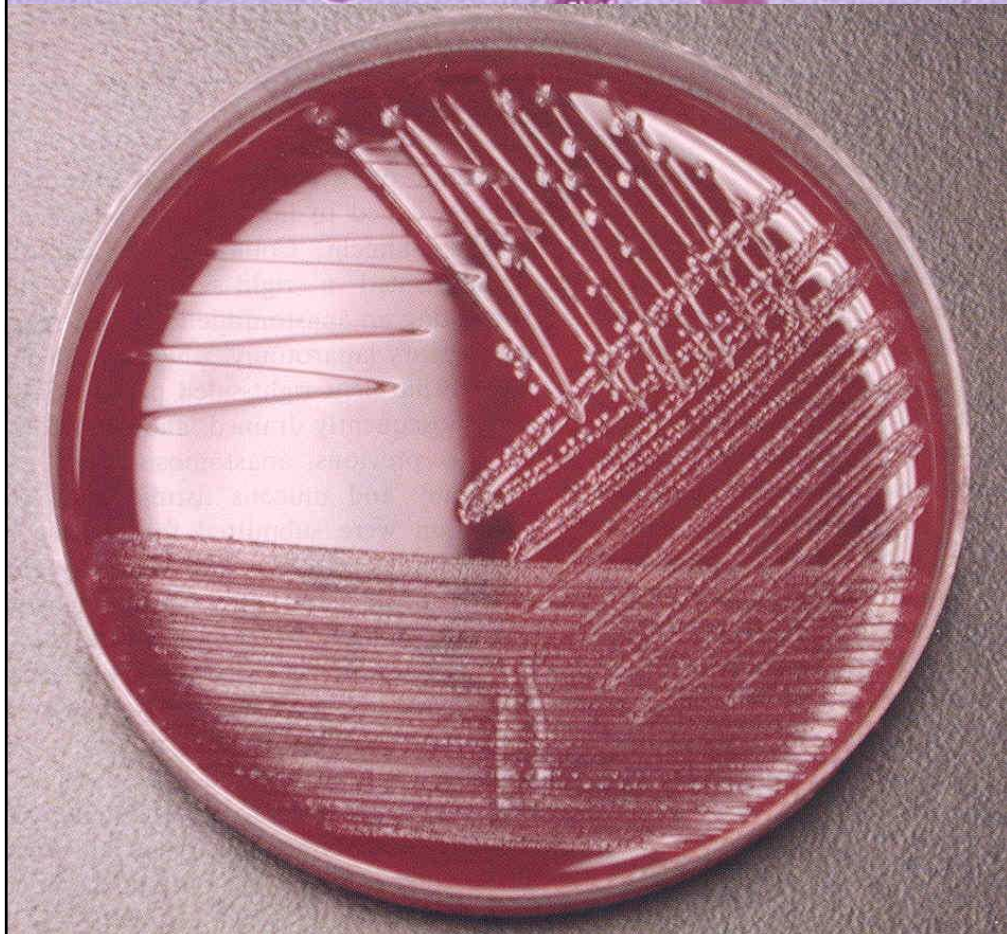
\*V praxi někdy vyrostou – běžně dosahovaná anaerobióza není dokonalá

\*\*V praxi někdy nevyrostou – běžně dosahovaná anaerobióza není dokonalá. Takové bakterie (EOS – Extremely oxygen sensitive) běžně nelze kultivovat





Různé  
anaeroby



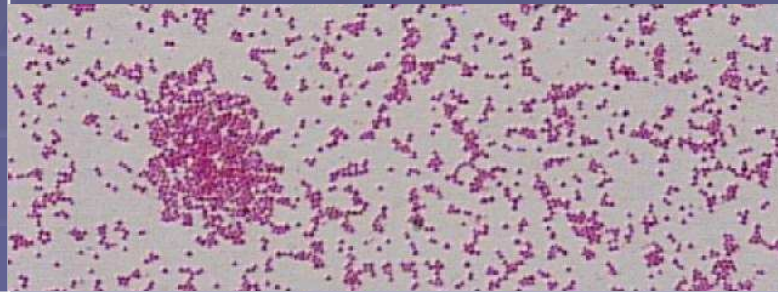
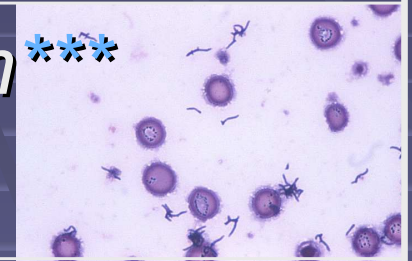


# Společné charakteristiky nesporelujících anaerobů

- Vyskytují se jako běžná flóra:
  - v tlustém střevě tvoří 99,9 % celkového objemu mikrobů, je jich tam kolem jednoho kilogramu
  - v ústech mohou žít díky biofilmu – jsou do něj zavzaty tak, aby neměly přímý přístup ke vzduchu, které by je ohrožoval
  - v pochvě nejsou přítomny u všech žen, ale uvádí se, že asi 70 % žen nějaké anaeroby v pochvě má; pokud se zde ovšem přemnoží, jde o dysmikrobii, kterou je nutno léčit
- Při zánětu obvykle neexistuje jeden původce, ale uplatňuje se směs. Někdy se používá termín „Veillonova flóra“

# Přehled nesporelujících anaerobů (u člověka nejběžnější druhy)

	Koky	Tyčinky
G+	<i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i>	<i>Propionibacterium</i> **** <i>Eubacterium</i>
G-	<i>Veillonella</i>	<i>Fusobacterium</i> , <i>Leptotrichia</i> * <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> **



\*se zašpičatělými konci

\*\*s rovnými konci tyčinky

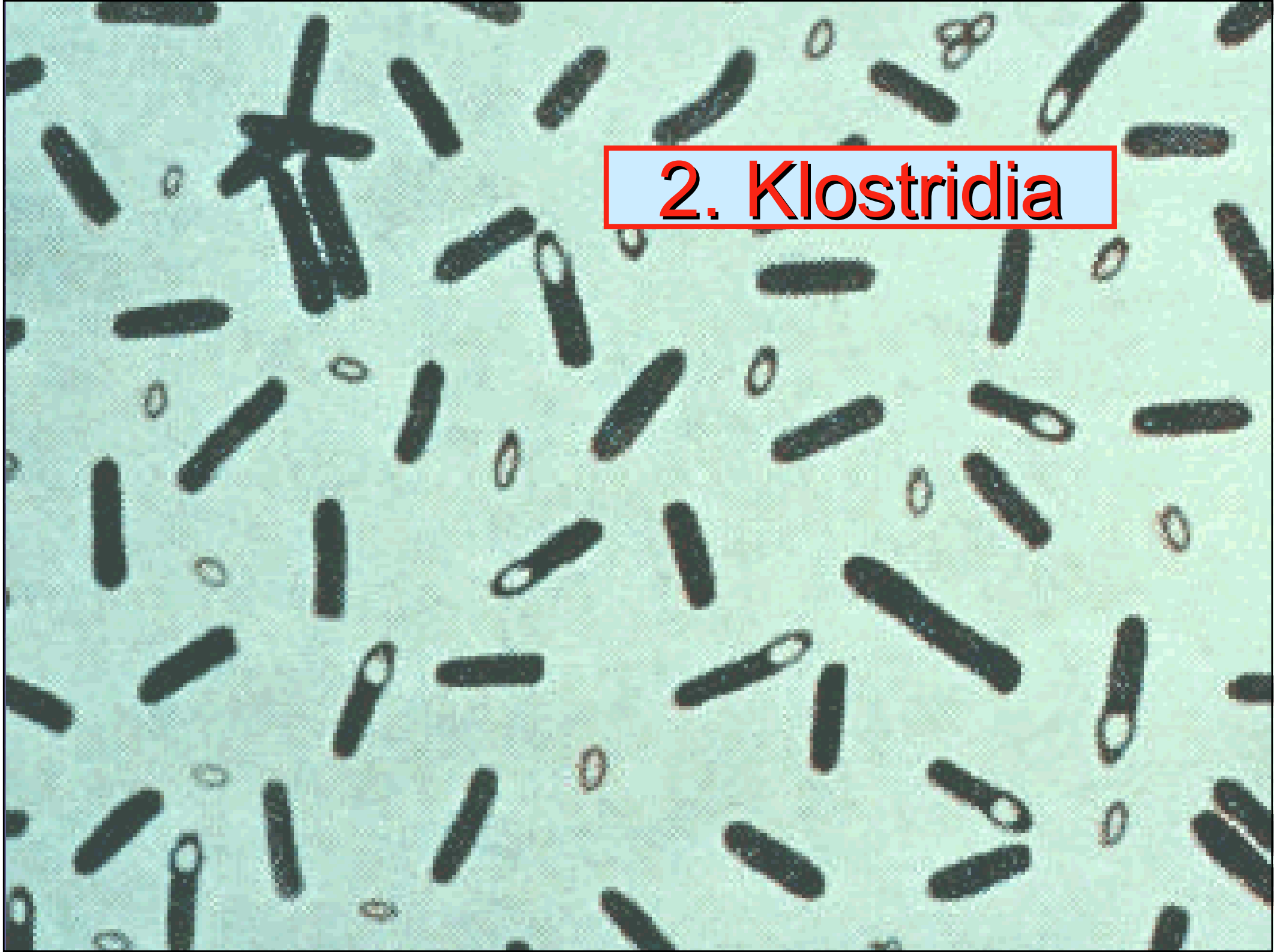
\*\*\*není stoprocentní anaerob

Diagnostiku probereme  
zároveň s diagnostikou  
klostridií

# Rozdíly mezi gramnegativními anaerobními tyčinkami

Rod <i>Bacteroides</i>	<i>Prevotella</i> a <i>Porphyromonas</i>
Převážně ve střevě	Převážně v ústní dutině
Rezistentní na penicilin	Bývají citlivé na penicilin
Biochemicky aktivnější	Biochemicky méně aktivní
Netvoří pigment	Často tvoří pigment
Původně všechny patřily do rodu <i>Bacteroides</i>	

## 2. Klostridia





# Úvod: Mikulecké pole trochu jinak

Mikulecké pole  
hluboko zorané

Nejedno *Clostridium tetani*  
v tom poli je schované

V poli je schované  
zalezlé ve spoře

Čeká až syneček nějaký  
to pole zas pooře...

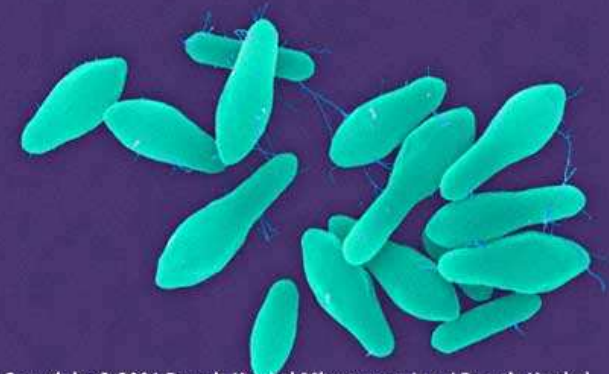
*(Zpívá se jako normální Mikulecké  
pole of Fanoša Mikuleckého)*

S takým klostridiem


Nedobře kočkovat

Nechaj sa, synečku  
zavčasu

pořádně přeočkovat...



# Klostridia – přehled

<i>C. tetani</i>	 <small>Copyright © 2001 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / Dennis Kunkel</small>	Původce tetanu
<i>C. botulinum</i>		Producent botulotoxinu
<i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. welchii</i> a aj.	Klostridia plynatých snětí	
<i>C. difficile</i>	Enteropatogenní	

Je potřeba si uvědomit, že i klostridia se úplně normálně podílejí na běžné střevní mikroflóře. Problém nastává, pokud se přemnoží, dostanou tam, kam nemají, vyskytne se kmen produkující velké množství toxinu apod.

# Příběh první

- Mustafa, kosovský Albáanec, se rozhodl, že navštíví svého bratrance v sousední vesnici. Pole, přes které se vydal, již mělo být odminováno. Přesto se jedna nevybuchlá mina ještě našla. Střepina, špinavá od bláta, se Mustafovi zasekla hluboko do stehna.
- Za několik dní byl Mustafa přijat do jedné z polních nemocnic. Stehno měl zduřelé a při poklepu byl slyšitelný zvuk praskajících bublinek. Mustafa byl hned operován.



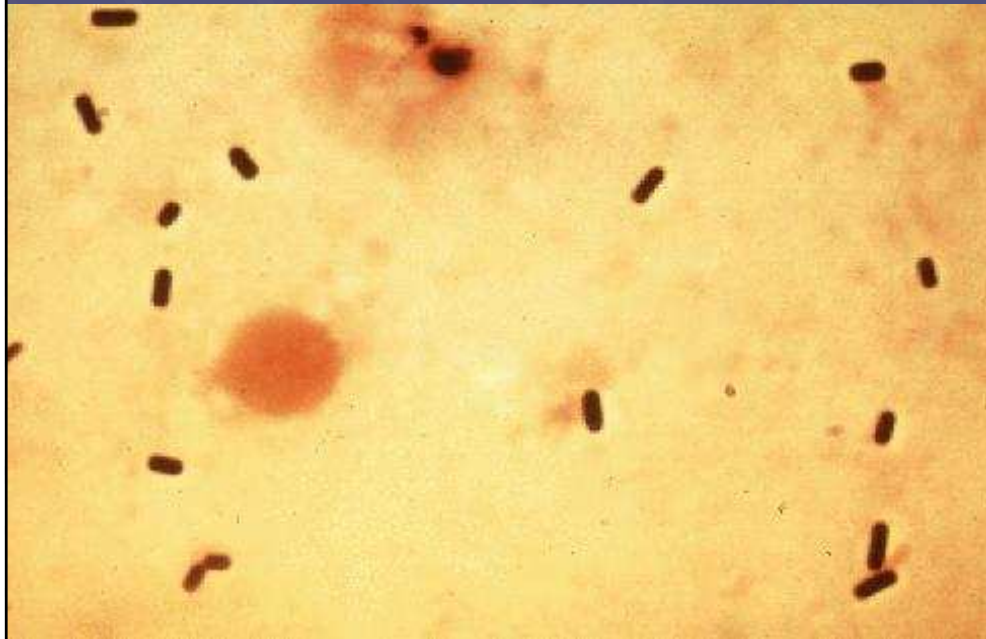
# Viníkem je tentokrát



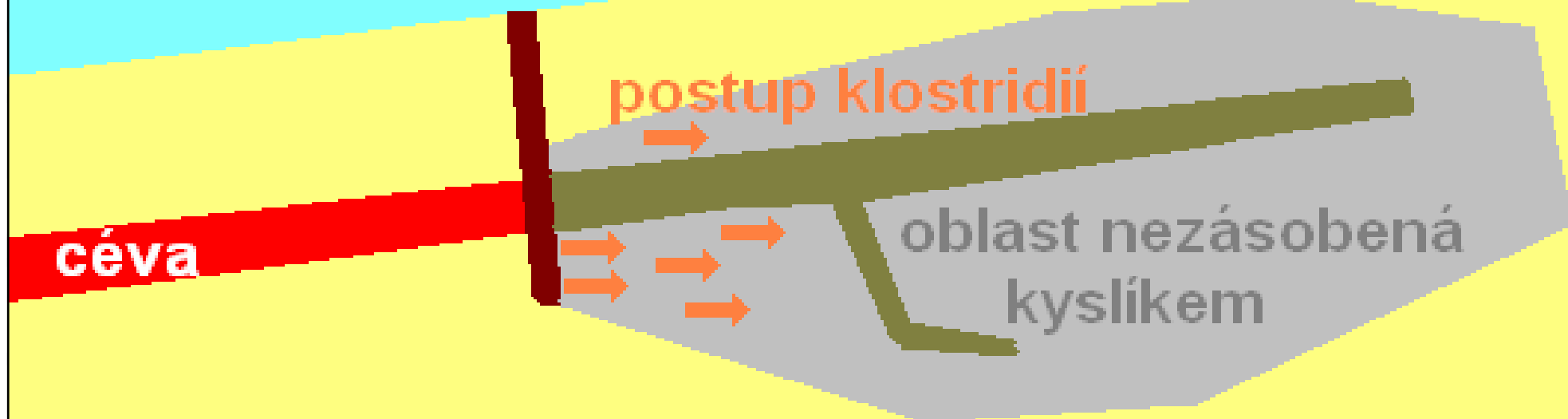
- *Clostridium perfringens*, jeden z původců plynaté sněti (spolu s *C. novyi*, *C. septicum* aj.)
- Plynatá sněť je typické válečné onemocnění. Může se však vyskytnout i v dobách míru, například při živelných pohromách
- Klostridia plynatých snětí – respektive jejich enterotoxiny – se také uplatňují jako patogeny ve střevě



# Vznik plynaté sněti



**zranění**

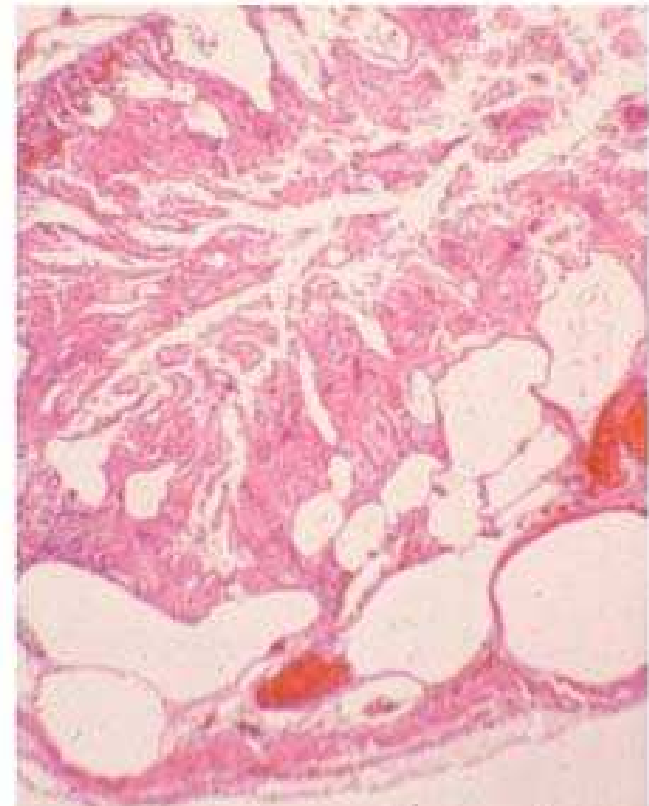
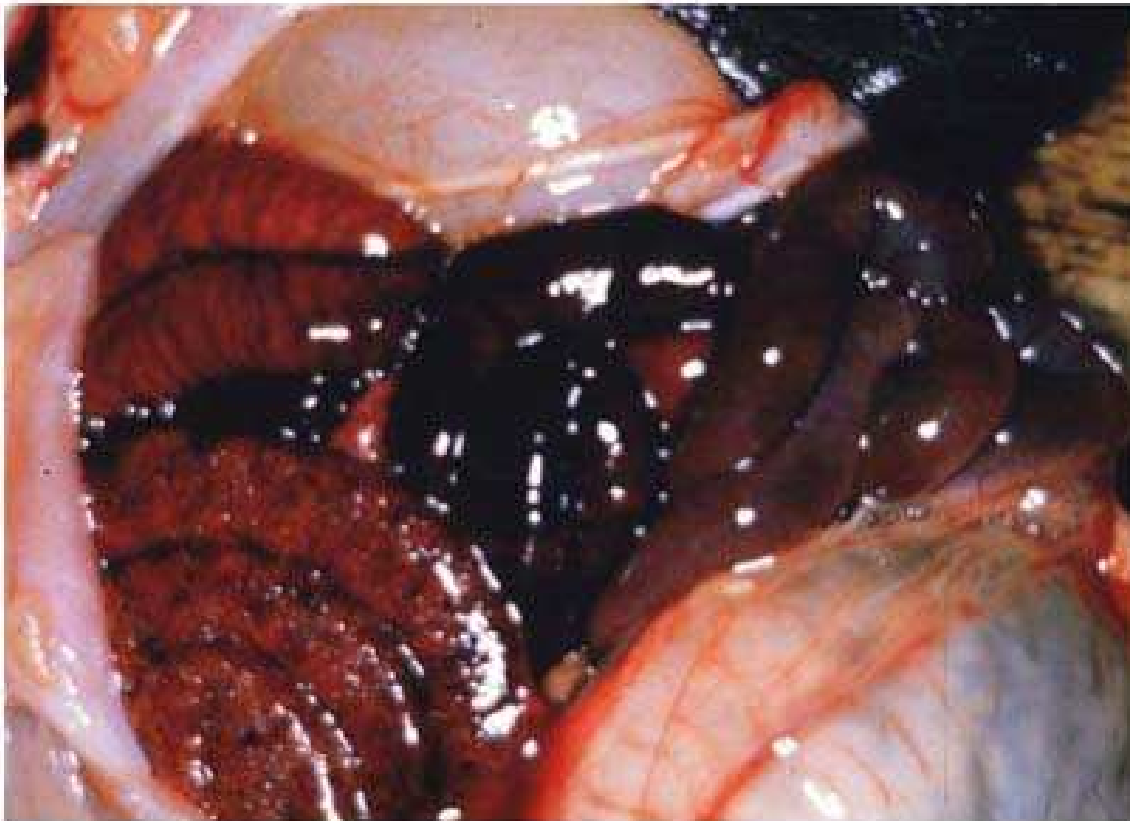


# Nekrotizující enterokolitida – i to může způsobovat *C. perfringens*

## 豚の壊死性腸炎 (Necrotic enteritis)

左: 小腸は出血しており、結腸には菌の産生したガスによる嚢胞が見られる。

右: 空腸の組織像。絨毛は壊死に陥り、固有層にはガスによる空胞が見られる。



# Příběh druhý

- Pan Kostečka ležel už třetí týden v nemocnici pro bakteriální zánět kostní dřeně. Zánět mu léčili klindamycinem, linkosamidovým antibiotikem. Náhle pan Kostečka dostal těžký průjem. Na oddělení zrovna neměli metronidazol, a tak sáhli po staré metodě: dali panu Kostečkovi vypít ampulku vankomycinu, antibiotika, které se normálně podává pouze injekčně, protože se nevstřebává ze střeva.



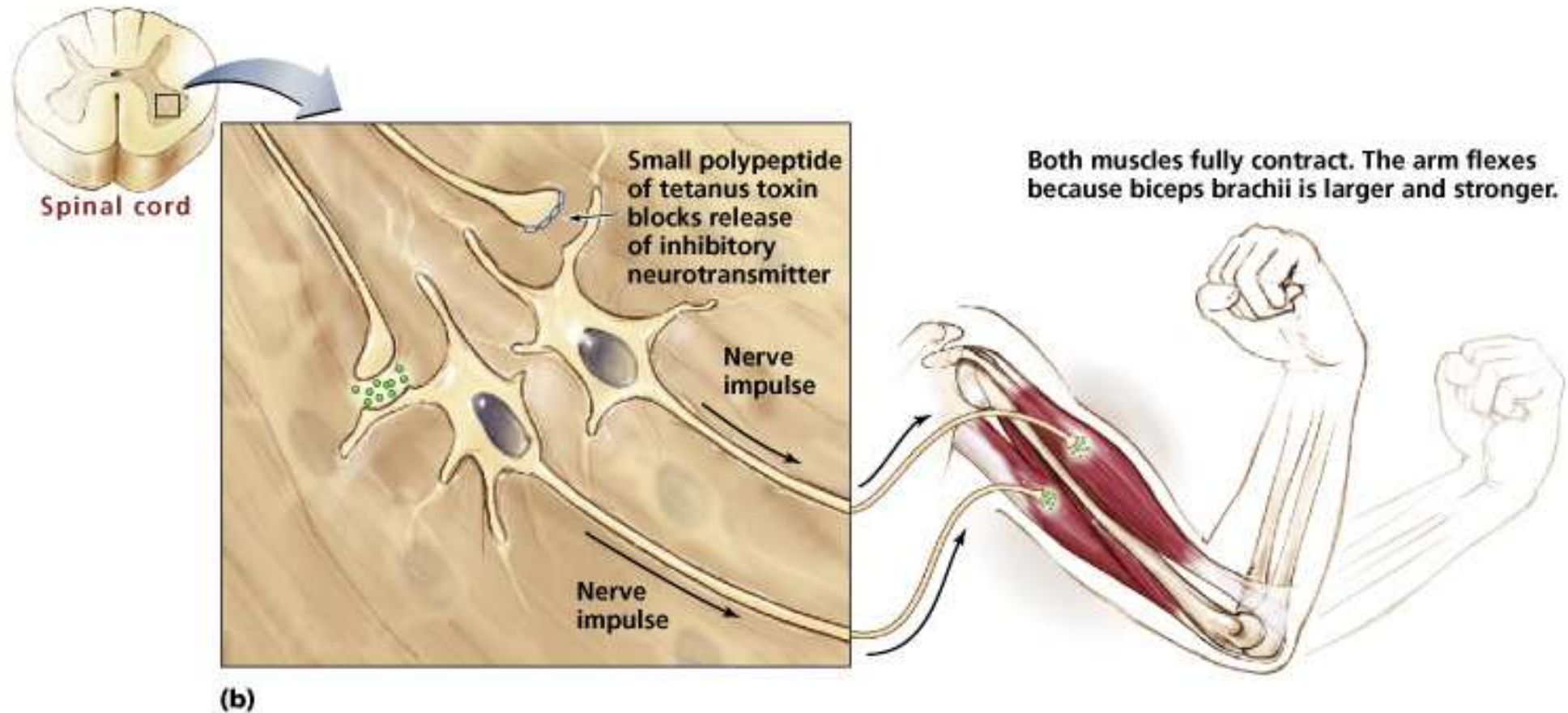
# Viníkem je



- *Clostridium difficile*, respektive jeho toxin
- Tento mikrob se vyskytuje ve střevě celkem běžně, problém však je, když začne produkovat toxin, a především, když mu někdo odstraní konkurenci a on se přemnoží.
- Odstranění konkurence způsobí nejčastěji léčba některými typy antibiotik, nejčastěji linkosamidy. Linkosamidy jsou účinné proti většině striktně anaerobních bakterií, nikoli však proti *C. difficile*.
- Dnes se k léčbě používá nejčastěji bakteriální chemoterapeutikum metronidazol



# Tetanus



# Tetanus



# Ještě jednou tetanus

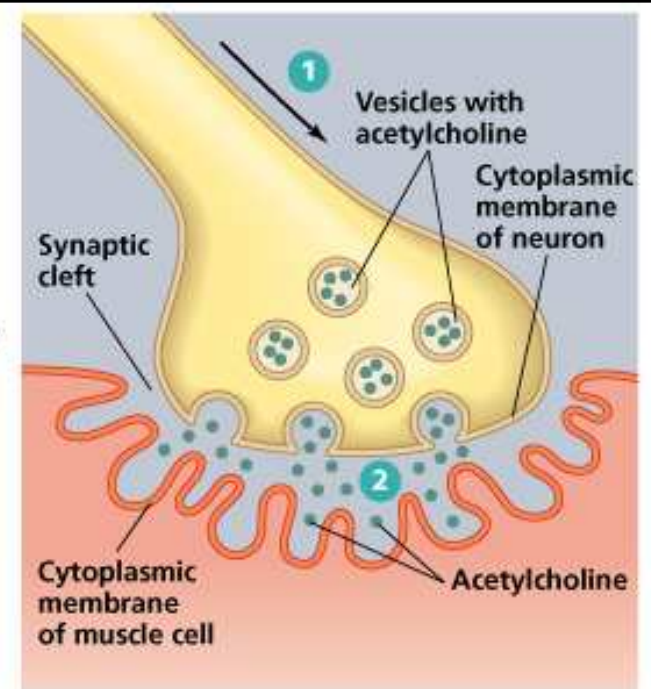
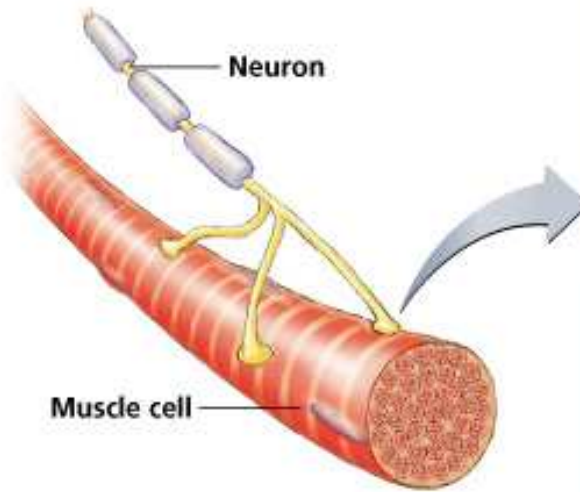


# Trismus (křeč čelistních svalů)

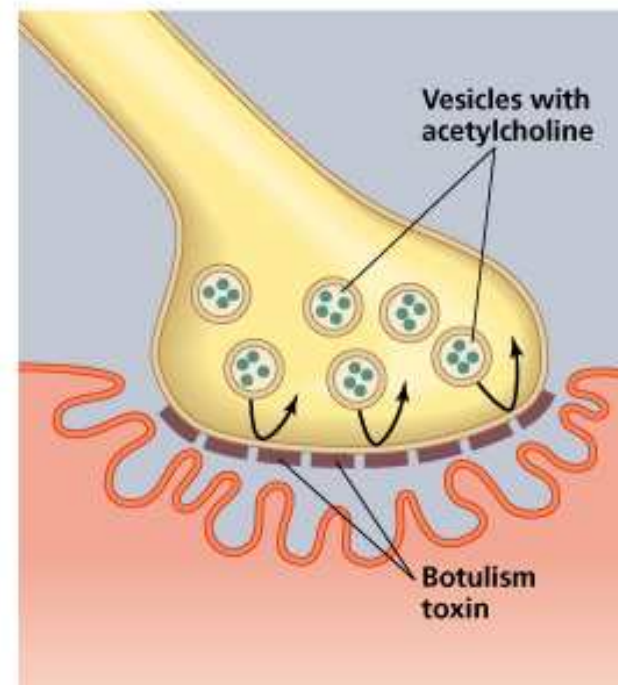




# Botulismus



(a) Normal neuromuscular junction



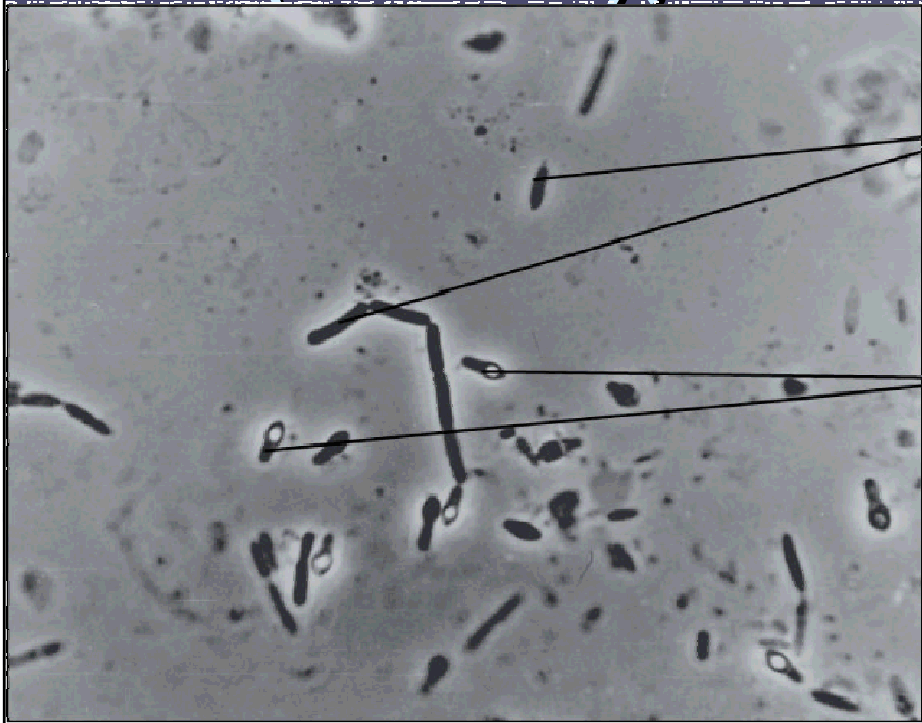
(b) Neuromuscular junction with botulism toxin present

# Typický vzhled jazyka při botulismu





# Defilé zločinců: *C. botulinum* (vlevo), *C. septicum* (vpravo)



Vegetative cells

Endospore-bearing cells

10  $\mu\text{m}$



# Diagnostika anaerobů (společná část k nesporelujícím i klostridiím)

- Mikroskopie: Má větší význam než u aerobů, vzhledem k morfologické různorodosti
- Kultivace: Je nutno zajistit anaerobiózu pomocí anaerostatů či anaerobních boxů. U tekutých půd postačuje přelití parafinem. Používá se VL (viande levure) bujón, VL krevní agar a různé speciální půdy
- Biochemie: kataláza a oxidáza většinou negativní, možné vzájemné rozlišení biochemicky, i analýza plynů chromatografií (jsou biochemicky aktivní)
- Antigenní analýza a nepřímý průkaz se v diagnostice anaerobů příliš nepoužívají

# Diagnostika anaerobů – pokračování

- Pokus na zvířeti se používá u tetanu a botulismu. U tetanu se myš svíjí v křeči (typické jsou napnuté končetiny a napružený ocas), u botulismu je naopak patrné ochabnutí končetin a celého těla.



Poněkud rozostřená  
tetanická myš (lepší  
jsem bohužel  
nesehnal)

# Opisthotonus

- Opisthotonus znamená esovitě prohnutí těla, případně i ocasu, jaké pozorujeme u pokusné myši



Podobně jako myš se do opisthotonu dostává i pacient



# K mikroskopii anaerobů

- Studenti někdy zaměňují spóru (útvár, který je neprobarvený, resp. jen slabě se rýsují jeho okraje) a ztluštění tyčinky (které se vyskytuje u některých tyčinek, které jsou nesporulující a zpravidla gramnegativní).
- U skutečných sporulujících mikrobů má význam sledovat umístění spór. U *Clostridium tetani* je spóra terminální (na konci umístěná)
- Anaerobní tyčinky jsou někdy velice různotvaré – v jednom preparátu najdete útvary od vláknitých až po prakticky kokovité



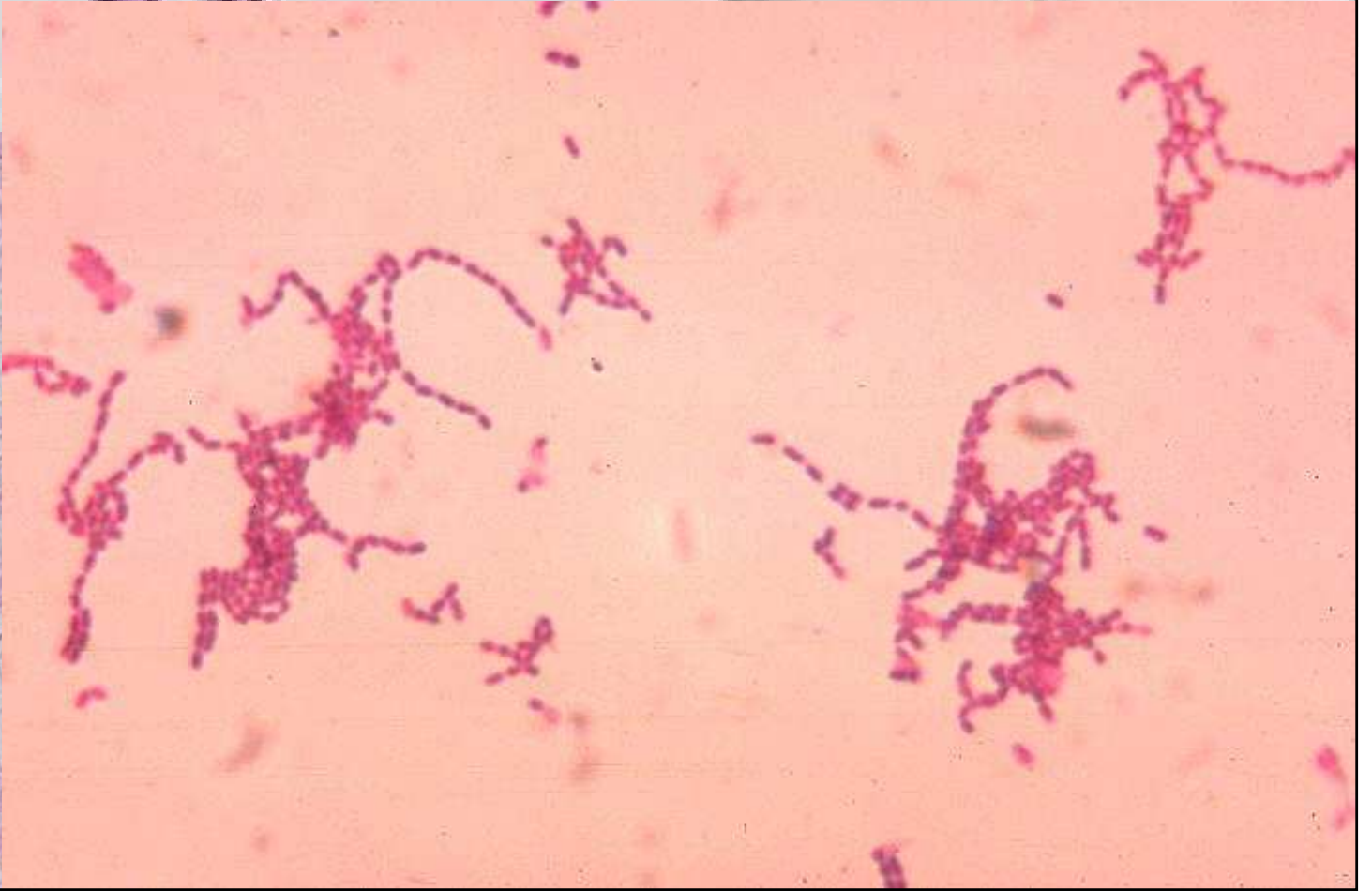
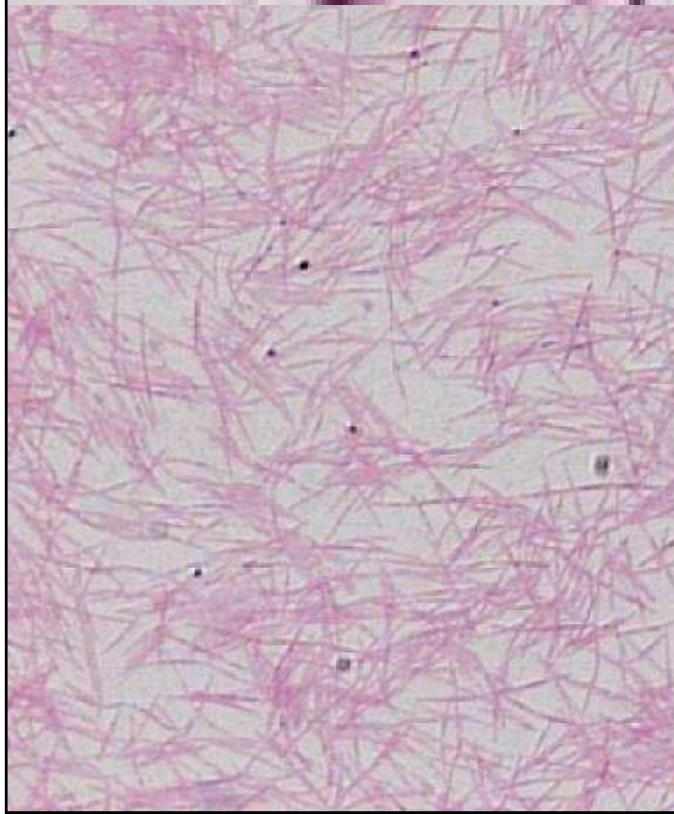
vřetenovité ztluštění  
("hodinková forma",  
často u rodu  
*Bacteroides*)



# *Bacteroides*

Dříve se používal pro tyto  
útvary název  
„Sphaerophorus  
necrophorus“, tedy  
„Kulonoš smrtonosný“







# Poznámka ke kultivaci anaerobů: Jak získat anaerobiózu

- Mechanicky – VL bujony přelijeme parafinovým olejem
- Fyzikálně – v anaerobním boxu se nahradí vzduch směsí anaerobních plynů, vháněných z bomby
- Chemicky – v anaerostatu se
  - z organických kyselin tvoří vodík a  $\text{CO}_2$
  - v druhé fázi na palladiovém katalyzátoru reaguje vodík s kyslíkem za vzniku vody, takže se kyslík spotřebovává

# Přelévání VL-bujonů parafinem



# Anaerobní box



# Anaerostat

Palladiový kalalyzátor  
(pod víčkem) nezbytný  
pro druhou fázi reakce

Generátor anaerobiózy  
(sáček s chemikáliemi)  
nutný pro celou reakci





# Anaerostat

podrobnější popis

vzduchotěsné víčko

palladiový kalalyzátor  
(pod víčkem)

konstrukce pro  
ukládání Petriho misek

Generátor anaerobiózy  
(sáček s chemikáliemi)



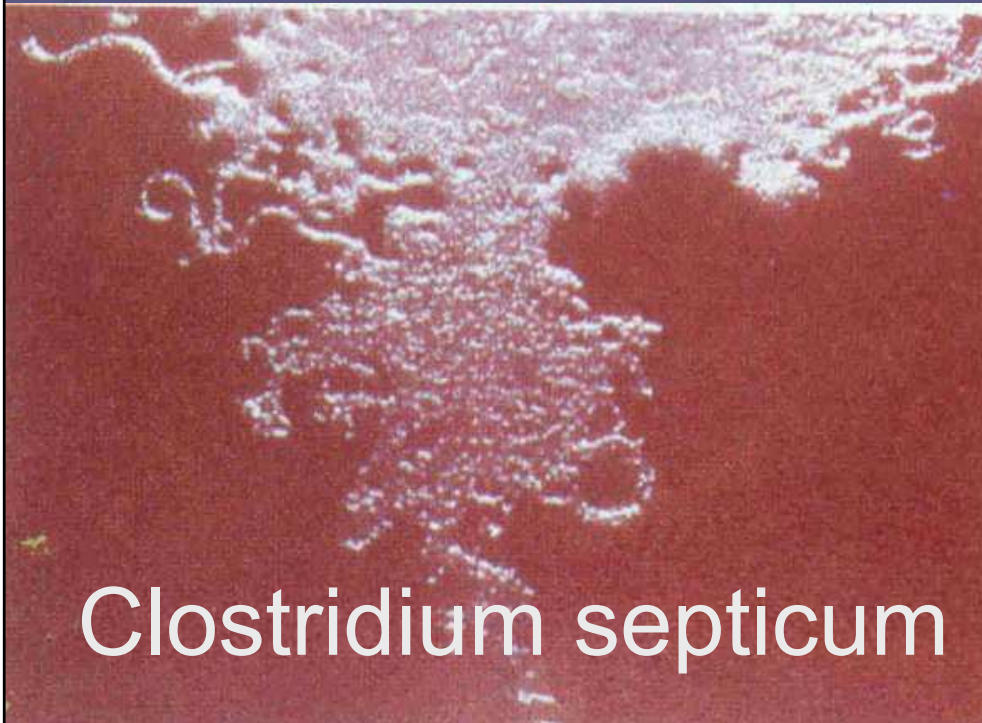
# Anaerostat jiné provenience

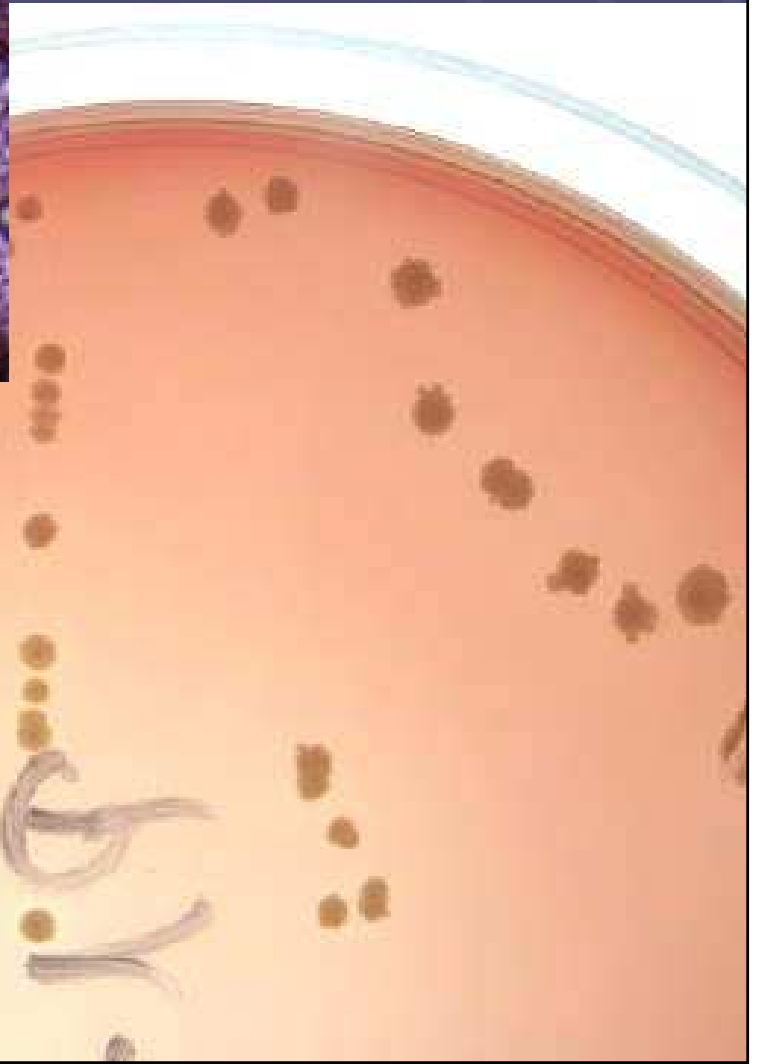
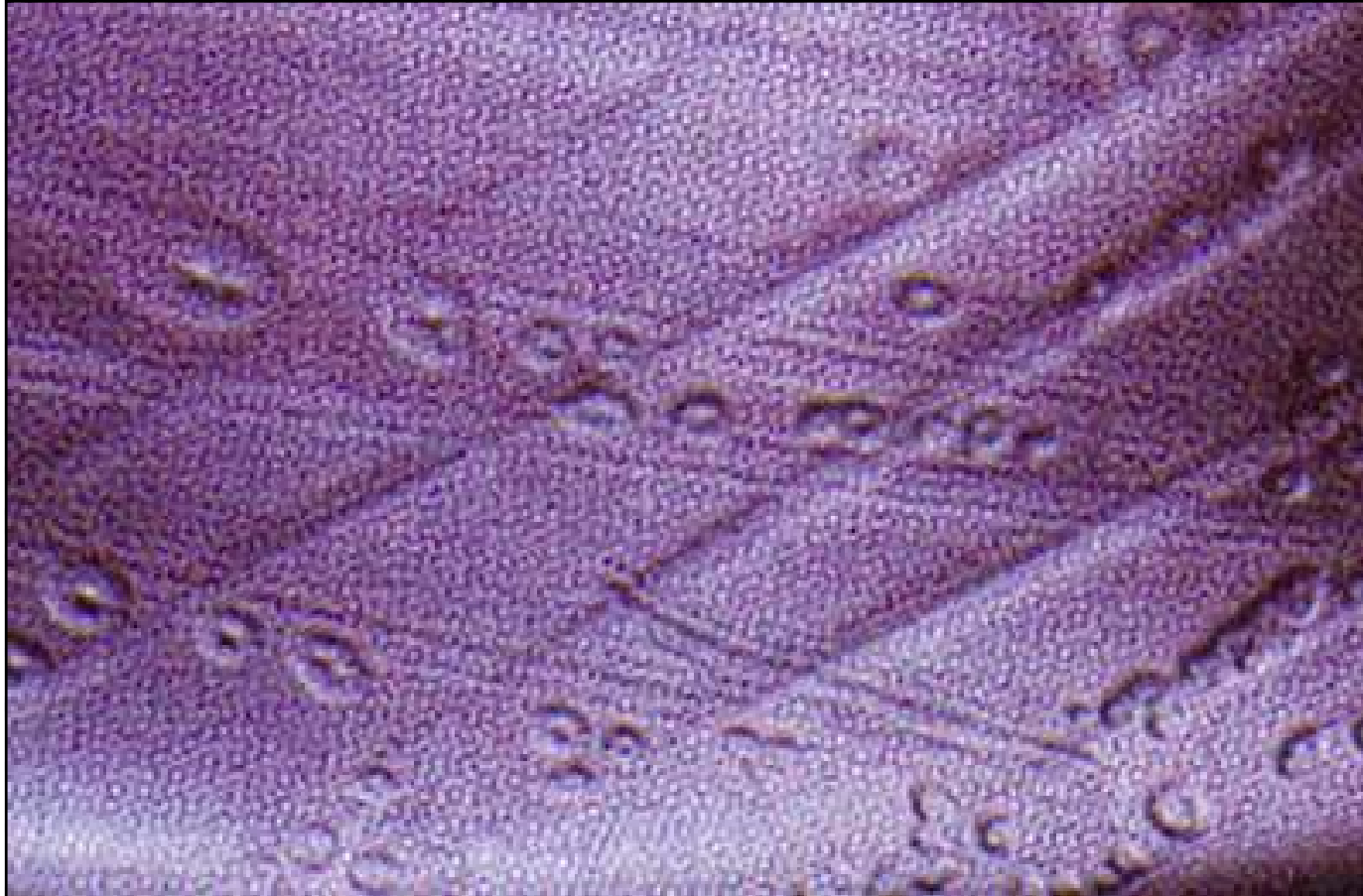
*Fusobacterium sp.*



# Ještě ke kultivaci

- Anaerobní bakterie rostou často v drobných, nepravidelných koloniích, které mají někdy výběžkaté okraje. Typický je pro ně také značný zápach.





Kolonie různých  
anaerobních  
baktérií





# Biochemické rozlišení

- Používají se různé testy, v našich podmínkách především ANAEROtest 23 Lachema.

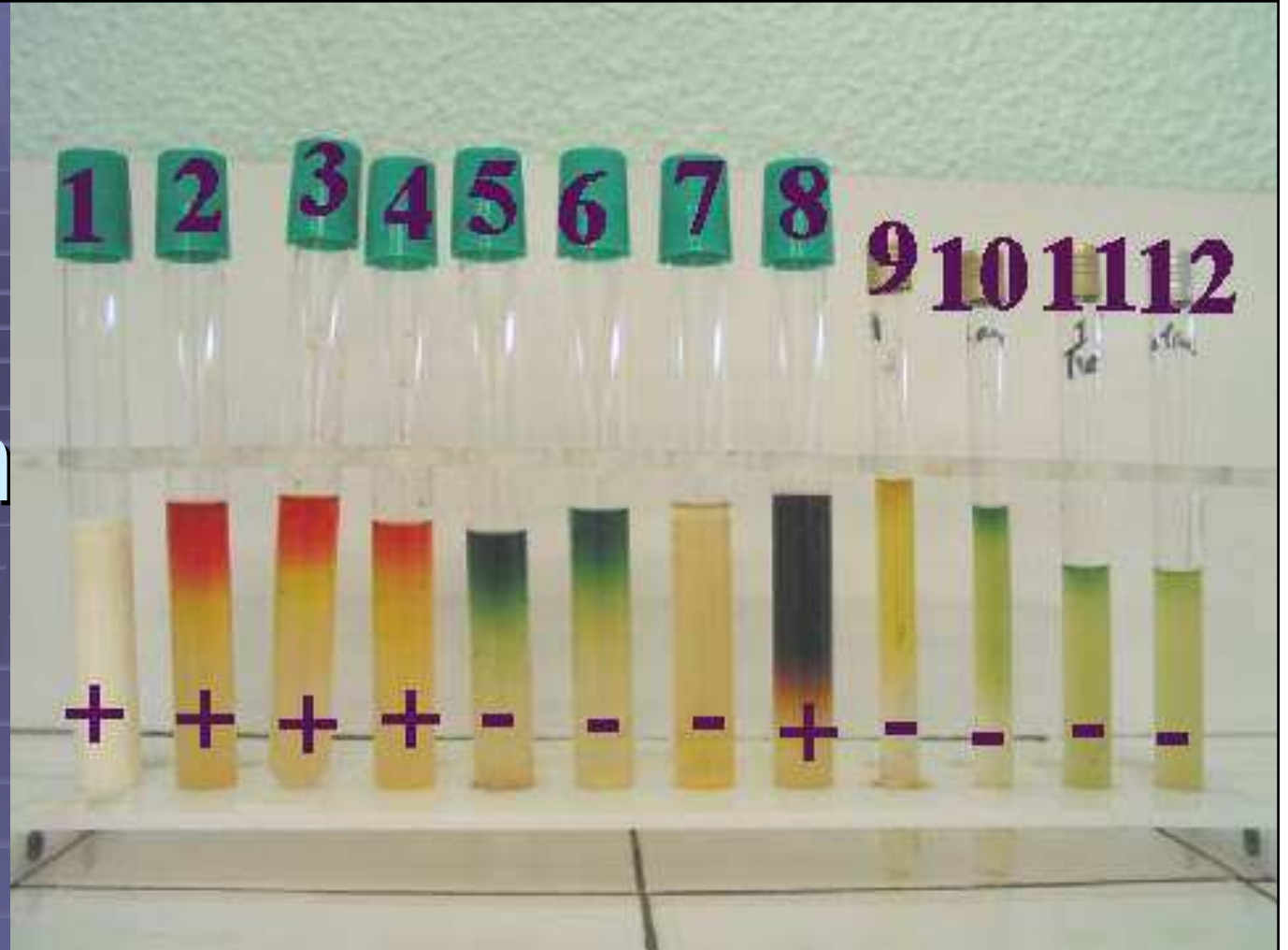


Kódová kniha je rozdělená na několik částí podle morfologie anaerobních bakterií. Je třeba hledat v té správné části kódové knihy

# Anaerotest - příklad odečítání

+	-	+	+	-	-	-	+
1	1	1	1	1	1		
-	+	+	-	+	-	-	-
2	2	2	2	2	2		
+	-	+	+	+	-	+	-
4	4	4	4	4	4		
5	2	7	5	6	0		

# Ukázky různých zahranických testů pro identifikaci anaerobů



# Testy antibiotické citlivosti

- Antibiotická citlivost se u anaerobů určuje na půdách, na kterých jsou schopny růst, tj. nikoli na MH agaru, ale zpravidla na VL krevním agaru
- Lékem volby u většiny anaerobů je opět klasický penicilin. Rezistentní je však rod *Bacteroides* (v užším slova smyslu – rody *Prevotella* a *Porphyromonas*, které se z něj kdysi odštěpily, jsou citlivé)

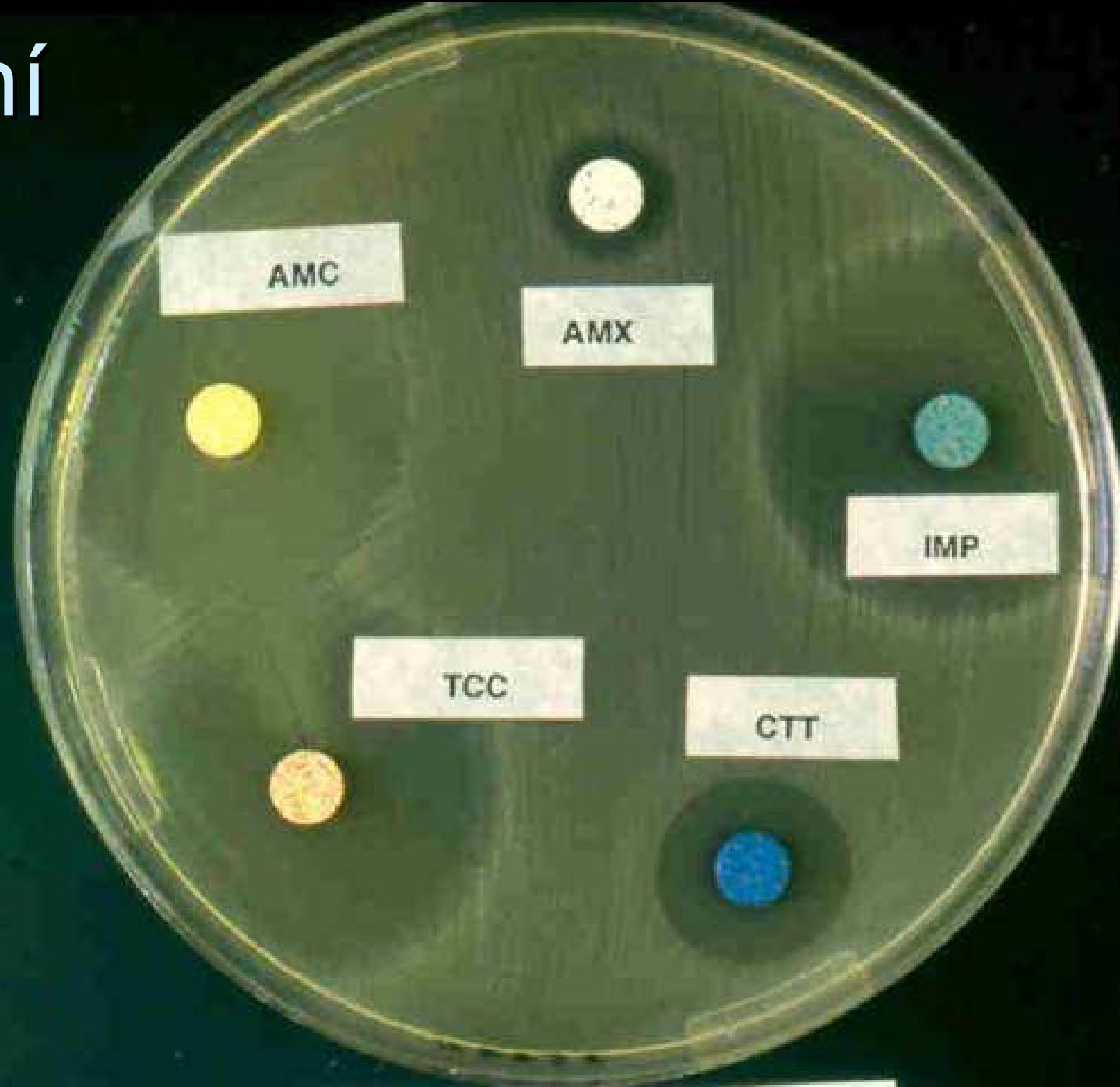


# Typické citlivosti

- Typické je, že mnohé anaeroby jsou rezistentní na vankomycin. Zároveň jsou přitom citlivé na „slabší“ antibiotika, jako je penicilin či metronidazol (na snímku)



# Ilustrační foto



*B. fragilis* ATCC 25285

# Průkaz tvorby lecitinázy – specialita v diagnostice *C. perfringens*

- Tvorba lecitinázy se projeví precipitací kmene na žloutkovém agaru. Protože však lecitináz je mnoho a nás zajímá pouze lecitináza *Clostridium perfringens*, prověřujeme, zda je lecitináza inhibovatelná specifickým antitoxinem.

„Negativní I“  
vůbec  
neprodukuje  
lecitinázu.

„Negativní II“  
produkuje, ale  
nějakou jinou,  
než nás zajímá



**pozitivní**  
**negativní I**  
**negativní II**

↳ **půlka s antitoxinem**

# Použity obrázky z adres:

01-05 [www2.bc.cc.ca.us/bio16/20\\_Nervpictures.htm](http://www2.bc.cc.ca.us/bio16/20_Nervpictures.htm).

06 [http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Clostridium\\_botulinum.jpg](http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Clostridium_botulinum.jpg)

07 <http://www.health.qld.gov.au/EndoscopeReprocessing/Module13d.htm>

08 - 10 [www.biotox.cz](http://www.biotox.cz)

11 [http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterio\\_web/exa\\_microscopiques/ana/Clostridium\\_difficile\\_spores.htm](http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterio_web/exa_microscopiques/ana/Clostridium_difficile_spores.htm)

12 <http://kherr14.myweb.uga.edu/botulism.html>

13 <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/cacnhomvikhuanchuyeu2.htm>

14 [http://www.ecureme.com/emyhealth/data/Clostridium\\_Difficile\\_Colitis.asp](http://www.ecureme.com/emyhealth/data/Clostridium_Difficile_Colitis.asp)

15 - 18 <http://www.niah.affrc.go.jp/disease/EM/atlas/bacteria0.html>

Clostridium prohlédnuto po stranu 5 včetně

19 <http://www.ulb.ac.be/sciences/biodic/ImBacterie20002.html>

20 21 [gold.aecom.yu.edu/id/micro/anaerobicjar.htm](http://gold.aecom.yu.edu/id/micro/anaerobicjar.htm)

22 [http://focus.hms.harvard.edu/2005/Sep16\\_2005/research\\_briefs.shtml](http://focus.hms.harvard.edu/2005/Sep16_2005/research_briefs.shtml)

23 - 45 <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/gallery.htm>

46 - 49 [www.microbes-edu.org/etudiant/anaerobies.html](http://www.microbes-edu.org/etudiant/anaerobies.html).

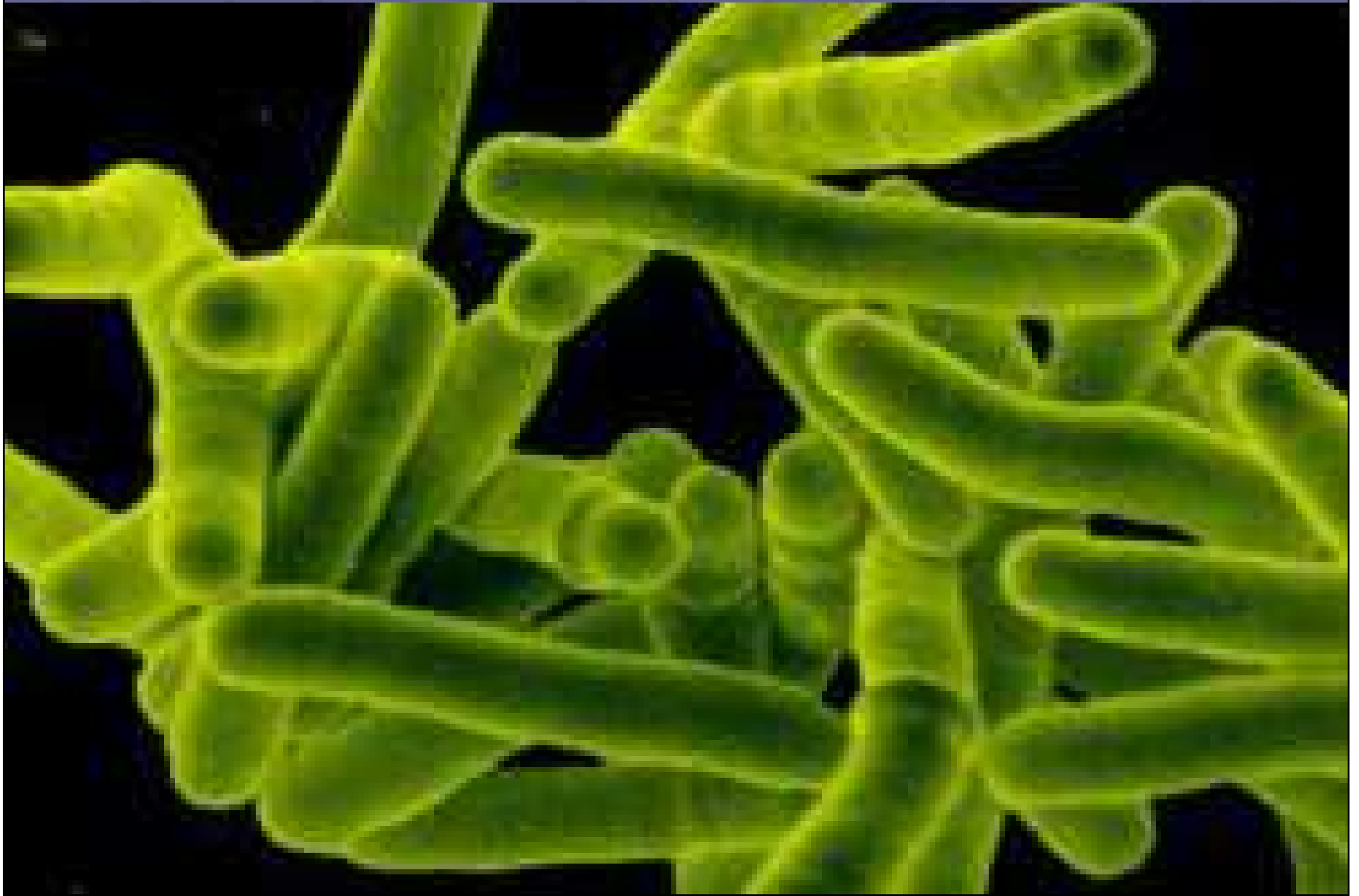
50 - 69 <http://pharmacie.univ-lille2.fr/recherche/labos/Bacteriologie/photos/index.php?album=7>

70 [microvet.arizona.edu/.../c\\_tetani.html](http://microvet.arizona.edu/.../c_tetani.html).

71 [http://www.bbc.co.uk/czech/svet/021007\\_botox\\_pckg.shtml](http://www.bbc.co.uk/czech/svet/021007_botox_pckg.shtml)



### 3. Mykobakteria, aktinomycety, nokardie



# Úvod: Plivátka v boji proti TBC

V době první republiky vyvinula společnost za osobní angažovanosti prezidenta Masaryka a jeho „Ligy proti tuberkulóze“ velké úsilí v boji proti této nemoci. Významnou součástí byla osvěta, aby lidé neplivali na zem, ale používali plivátka.



- Honza již několik let věděl, že je HIV pozitivní. Dobře věděl, že je mnohem zranitelnější než ostatní lidé, že ho každá infekce dostihne rychleji než jiné
- Přesto ho zaskočilo, že v poslední době začal kašlat. Jeho ošetřující lékaři zkoušeli různé možnosti, až nakonec na základě rentgenu, PCR vyšetření a kultivačního vyšetření dospěli k názoru, že se jedná o miliární (zrnkovitou) formu tuberkulózy.

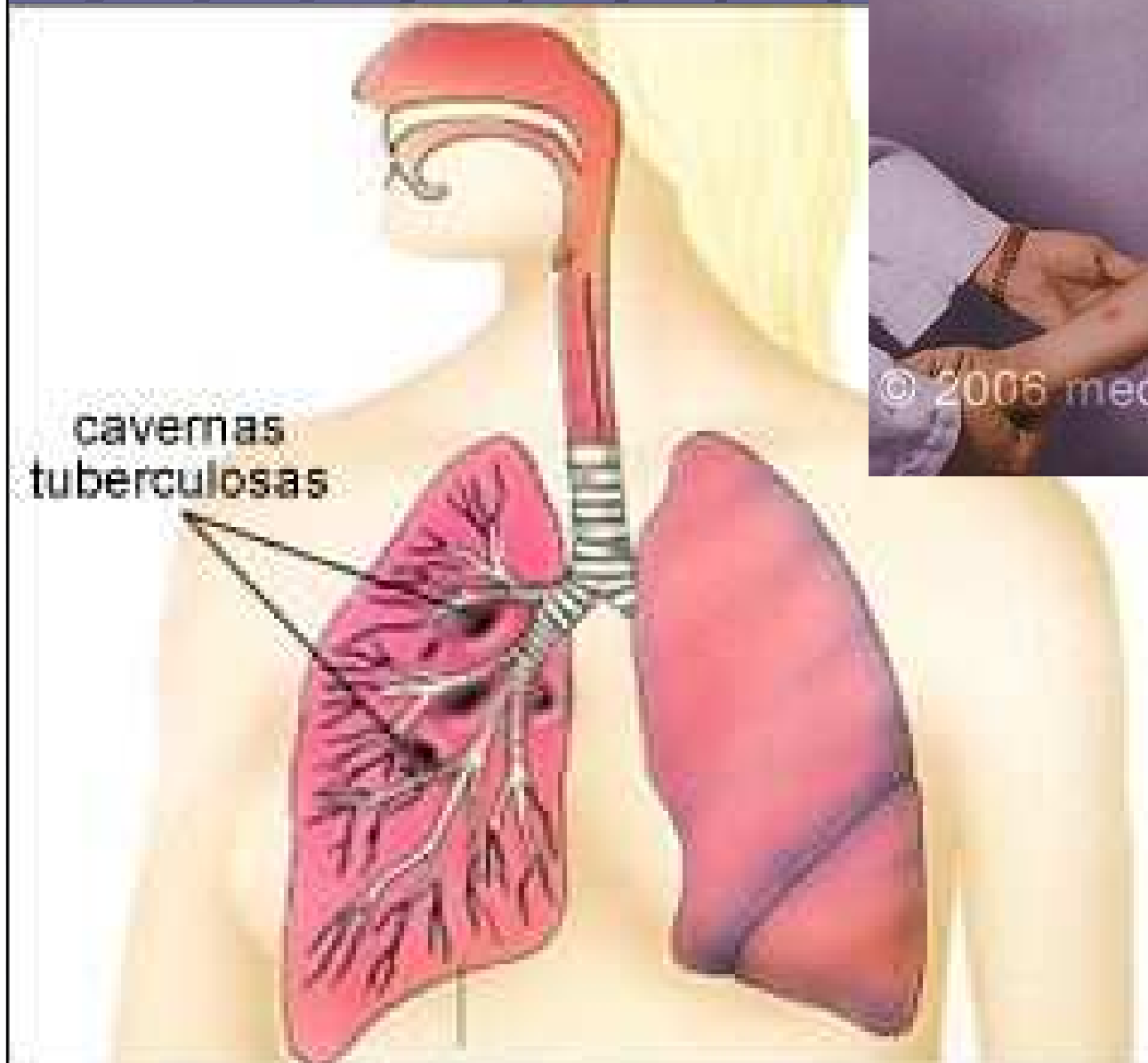
## Příběh první



# Viníkem zde bylo

- *Mycobacterium tuberculosis*, i když TBC může způsobovat i například *Mycobacterium bovis*.
- Zajímavostí tohoto mikroba je záliba v životě uvnitř buněk. S tím také souvisí skutečnost, že na mykobakteria se špatně tvoří protilátková odpověď (takže se nedá prokázat antigen ani protilátky) a že hlavní slovo má buněčná imunita – i při vakcinaci.
- Jelikož při HIV infekci je právě buněčná imunita postižena, je TBC jednou z oportunních infekcí.

# Tuberkulóza

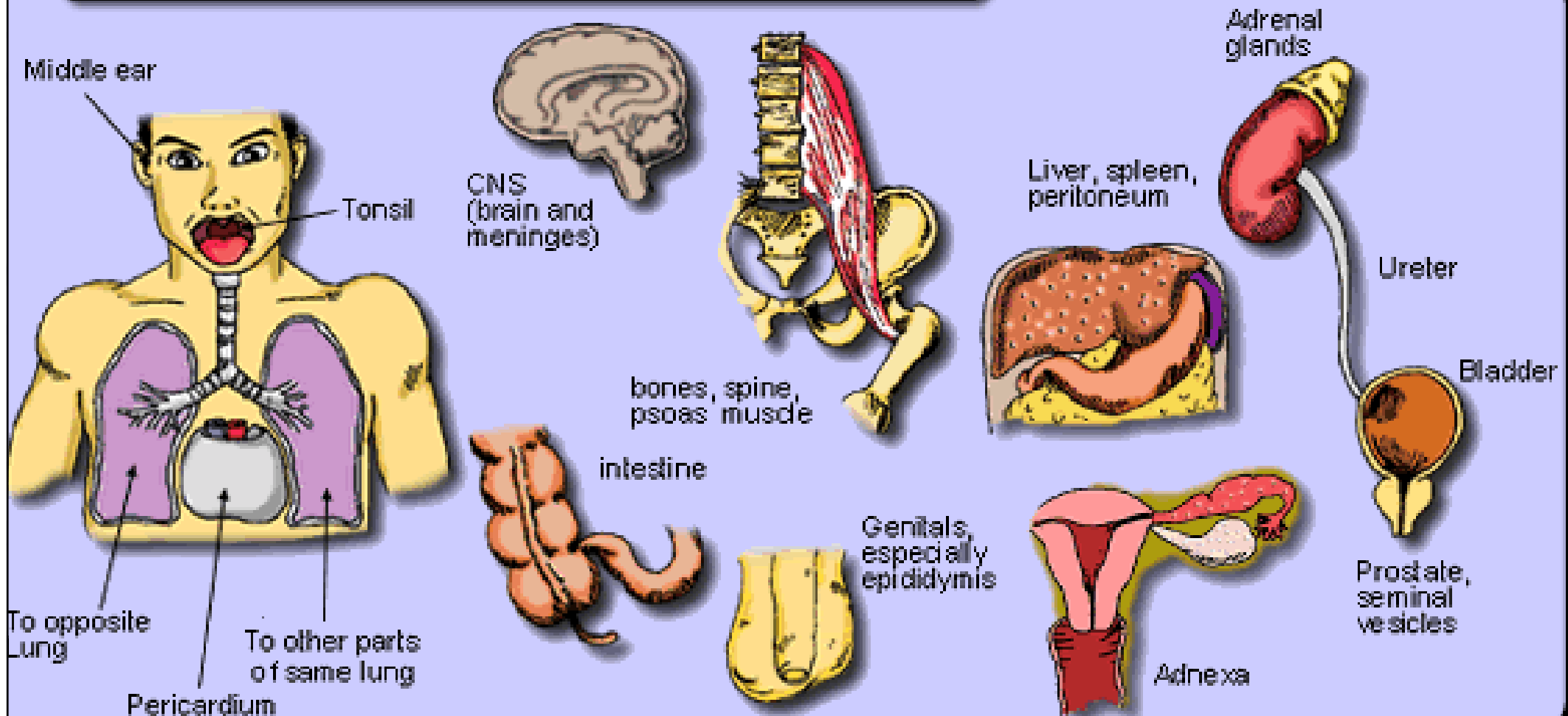




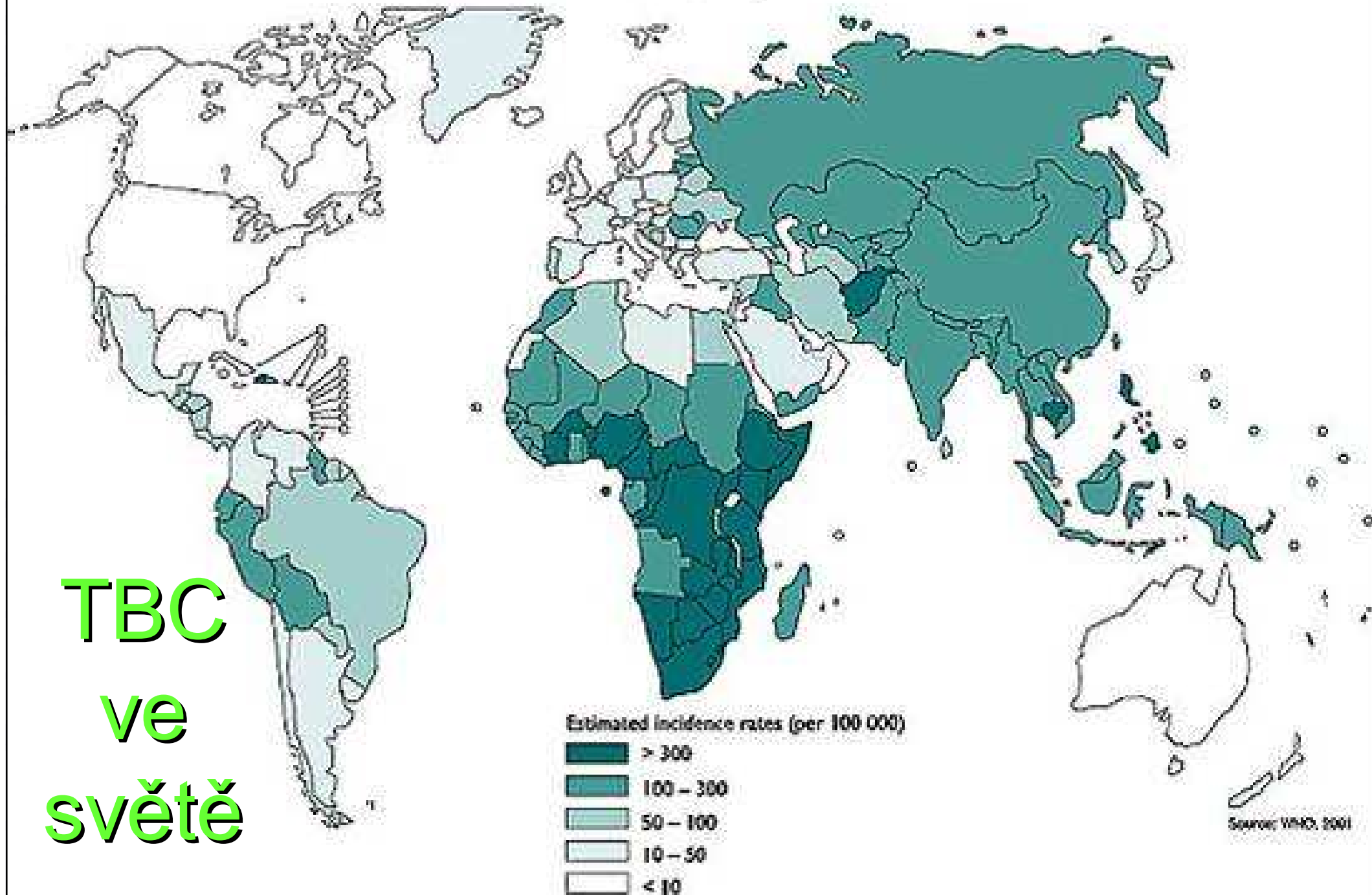
# Není jen plicní forma TBC



## Tuberculosis Affects Many Parts of the Body

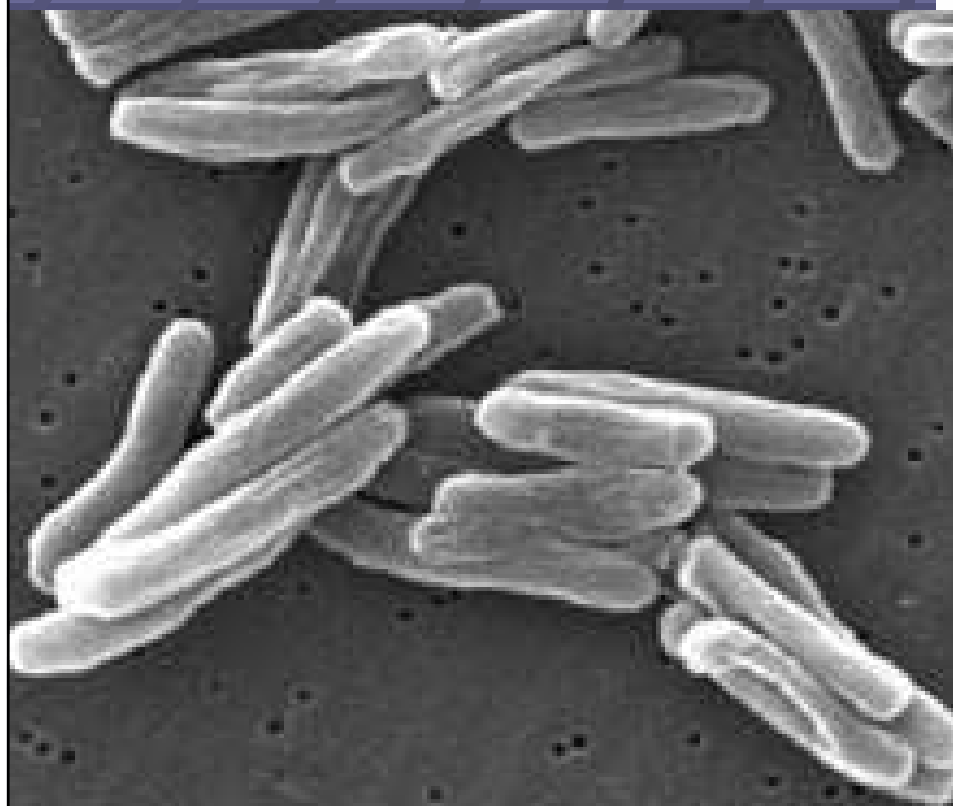


## Tuberculosis, 2000



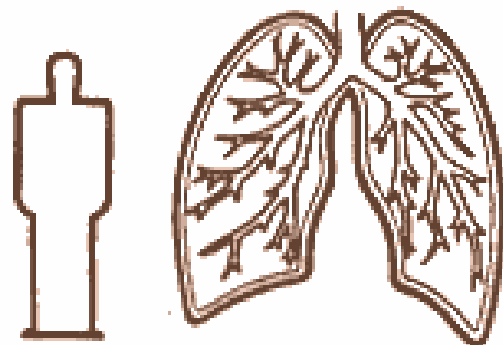
TBC  
ve  
světě

# Ještě jednou TBC

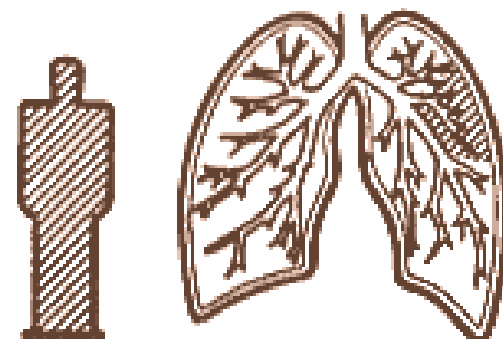


Dist WD Exp  
SE 7.4 0  
2 µm

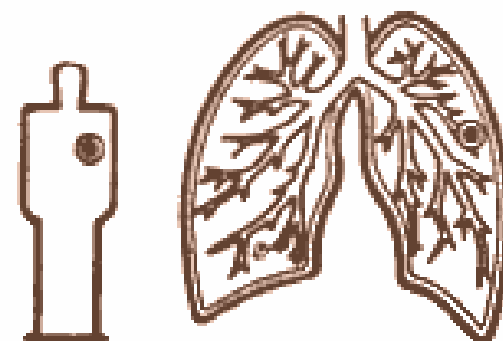
## Tuberculosis Develops by Stages



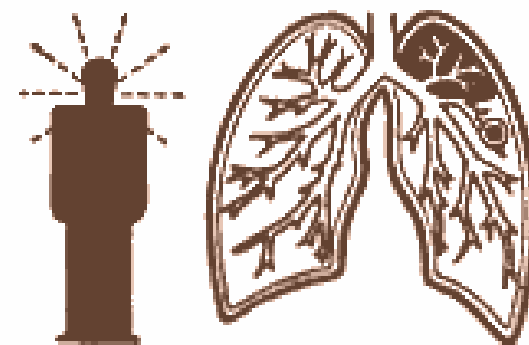
Every person is born with healthy lungs



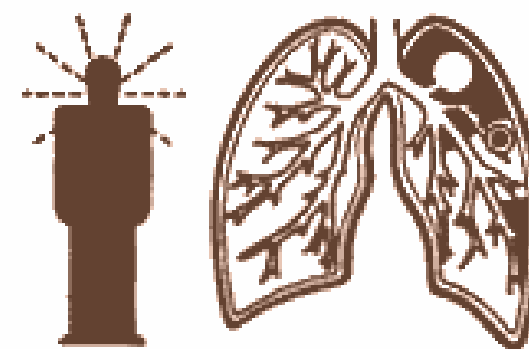
Many of us become infected from other people as we grow up.



The first infection usually heals. The person is well and no germs escape from his lungs. It is important to find this first infection in children.



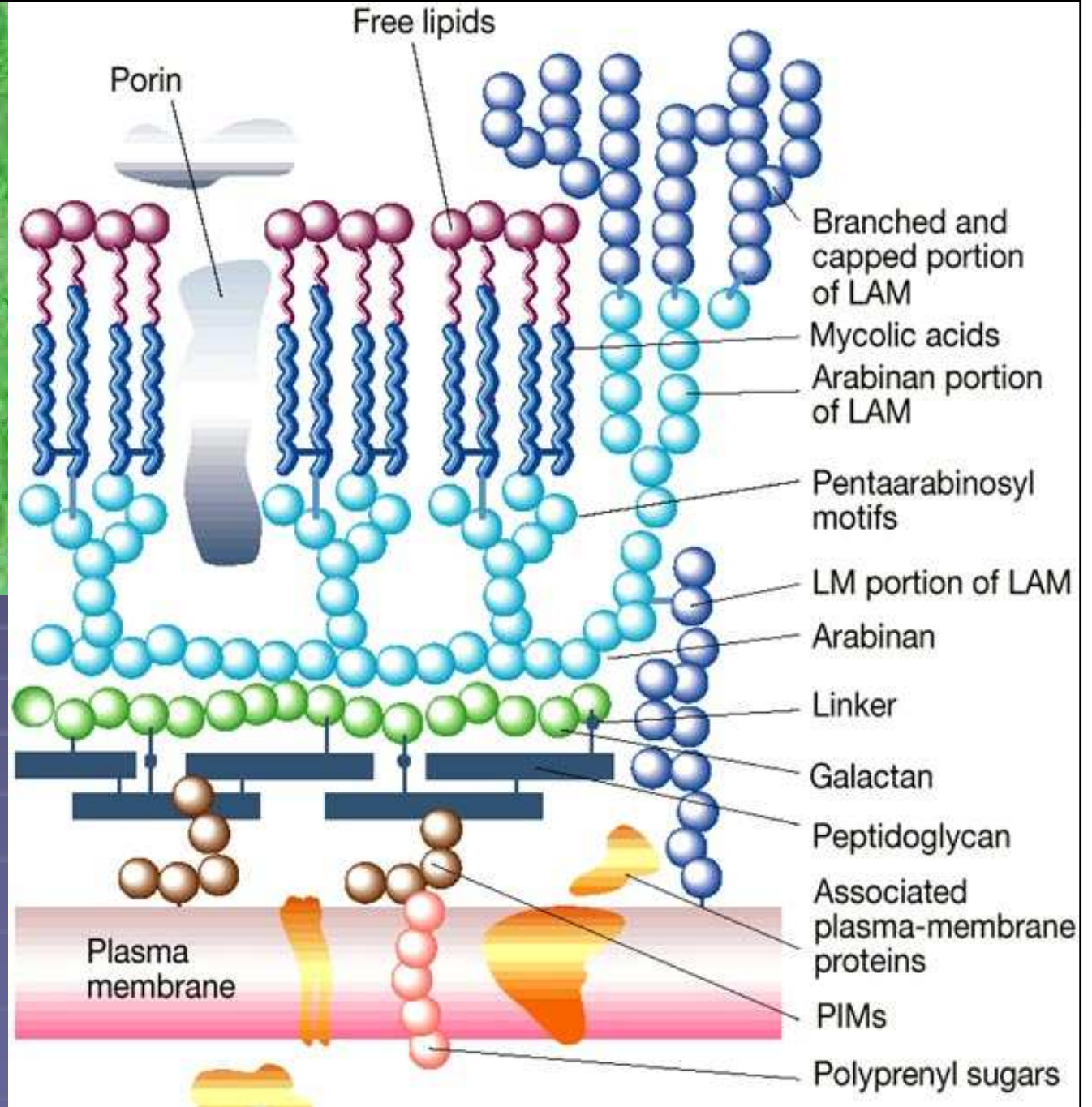
If later a person becomes infected again, the serious disease tuberculosis may begin. The germs that escape from the lungs are likely to infect others.



If tuberculosis is not discovered early, the disease spreads. A hole (cavity) may form in the lung which is an incubator of germs that escape and menace everybody who comes in contact with the sick person.

# Další zvláštnosti mykobakterií

- Jejich buněčná stěna je vysoce hydrofobní, jsou v ní tzv. mykolové kyseliny. Téměř se nebarví podle Grama, jsou nutná speciální barvení.
- Roste pomalu, má dlouhou generační dobu, proto jsou pro kultivaci nutné speciální půdy
- Jsou velmi odolná k desinfekčním prostředkům. Nelze použít prostředky spektra „A“, proti běžným bakteriím, je nutné „T“ (proti TBC), případně „M“ (proti atypickým mykobakteriím)
- Jsou též odolná k antimikrobiálním látkám.



# Buněčná stěna mykobakterií



# Příběh druhý

- Pan Hassan žil v pouštní části Súdánu, zmítané neustálými válkami a nepokoji.
- V poslední době se od něj začali odvracet i ti přátelé, kteří ještě neuprchli ani nebyli povražděni. Znetvoření obličeje pana Hassana bylo neklamnou známkou, že pan Hassan trpí onemocněním, které se v těchto zeměpisných šířkách ještě stále vyskytuje až příliš často.
- Naštěstí se pan Hassan setkal s pracovníky jedné nevládní organizace, kterým rovněž byla diagnóza jasná. Pomocí dapsonu se podařilo panu Hassanovi pomoci.

# Viníkem je

- *Mycobacterium leprae*, mikrob ještě zvláštnější než tuberkulózní mykobakterium
- Jeho generační doba je ještě výrazně delší. In vitro kultivace se podařila teprve nedávno a trvala celý jeden rok
- Základní léčba lepry není drahá, bohužel v zemích, kde se lepra vyskytuje, je i tato poměrně nízká cena příliš vysoká
- Proto se problémem lepry zabývá řada nadací, nevládních a charitativních organizací a podobně.

# Lepra





# Jiná mykobakteria



- Kromě *M. tuberculosis* a *M. leprae* existuje i spousta dalších mykobakterií. Některá, např. *Mycobacterium marinum*, patří mezi tzv. atypická mykobakteria, která občas způsobují infekce ran a jiné problémy. Některá mykobakteria jsou nepatogenní a jsou normální součástí lidské mikroflóry, např. *M. smegmatis* – viz obrázek

# Příběh třetí

- Paní Píšťelková si už delší dobu hmatala pod kůží krku drobné útvary
- Nedávno se stalo, že jeden z těchto útvarů se otevřel na povrch a v ústí se objevil velmi hustý, žlutý páchnoucí hnis. To už paní Píšťelkovou donutilo zajít k lékaři.
- Lékaři poslali hnis na mikrobiologické vyšetření. Vyšetření trvalo dlouho – paní Píšťelková už spílala mikrobiologům, že si tam někde válejí šunky. Nakonec se ukázalo, že...



# ...jde o aktinomykózu



- tedy že viníkem je *Actinomyces* sp.
- Aktinomycety jsou vláknité bakterie, v podstatě grampozitivní, ale barví se Gramem špatně, protože jejich buněčná stěna je hodně hydrofobní a obsahuje hodně mykolových kyselin
- Aktinomycety se běžně vyskytují v ústní dutině zdravých osob. Odtud se za různých okolností mohou dostat do měkkých tkání krku, tváře či hrudníku. Jsou to anaerobní bakterie
- Podobné aktinomycetám jsou nokardie, které jsou naopak striktně aerobní. Jinak však mají hodně podobné vlastnosti.

# Nokardióza mozku na CT



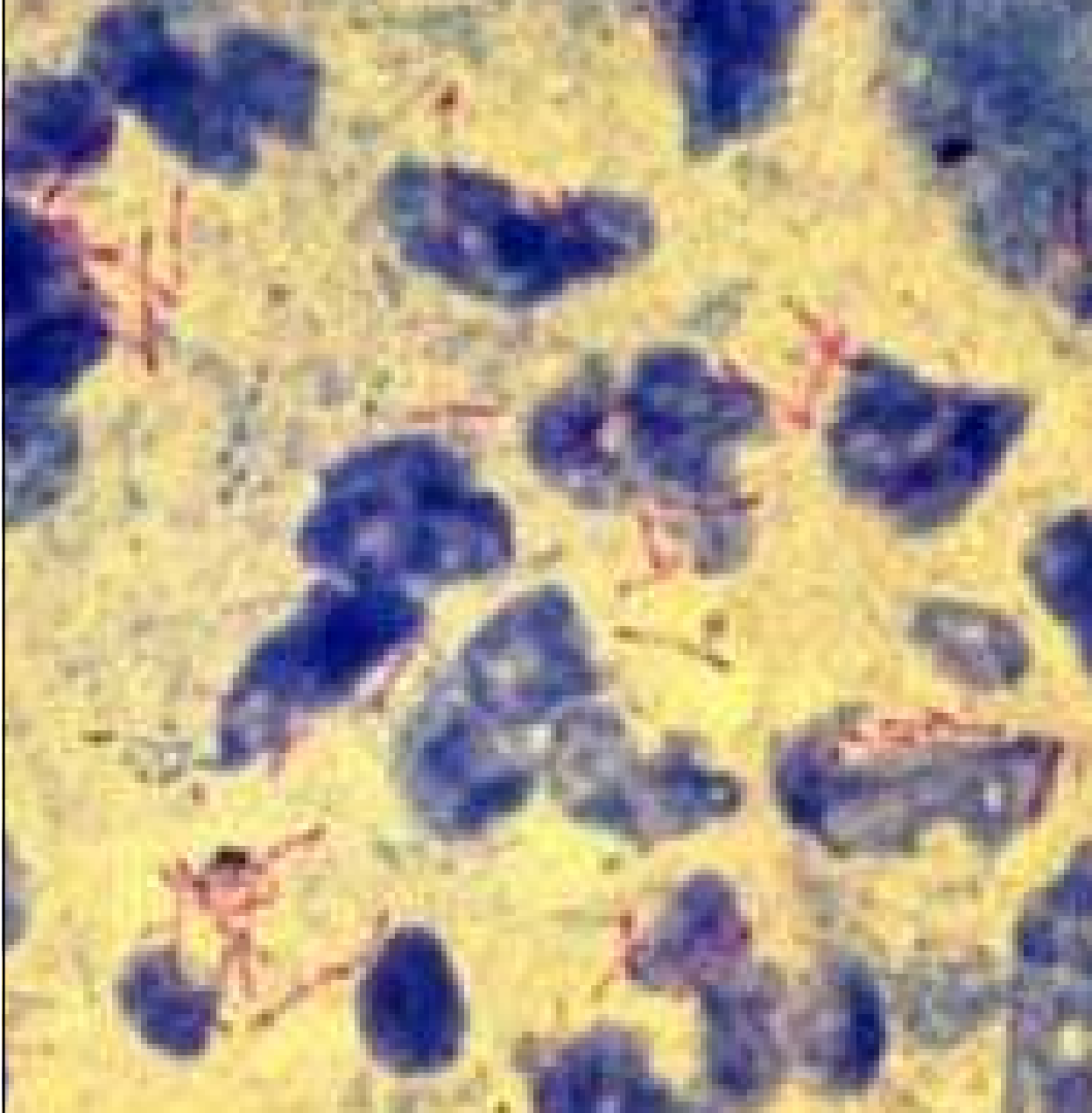
# Acidorezistence a alkalirezistence

- Aby mohly na něco působit kyseliny či alkalie, musí to „něco“ být hydrofilní, tedy komunikovat s vodným prostředím. Pro mykobakteria však tohle neplatí.
- Nejsme tedy schopni je kyselinami či alkaliemi ničit
- Nejsme také schopni je kyselinami odbarvovat, pokud tedy se je nějakým zázrakem podařilo obarvit
- Totiž: většina barviv je také hydrofilních, a tudíž se mykobakteria i špatně barví, zpravidla je nutno barvit je za horka, aby se vůbec obarvila
- Nokardie a aktinomycety jsou na rozdíl od mykobakterií acidorezistentní jen zčásti. Barvíme je proto podle Grama, ale musíme počítat s tím, že se barví nerovnoměrně a špatně.

# Co z toho vyplývá pro klinika?

- Pokud klinik pošle vzorek (sputum, moč, hnis či cokoli jiného) „na bakteriologickou kultivaci“, nemůže očekávat, že vyšetření odhalí případnou přítomnost mykobakterií
- Chce-li klinik zjistit, zda má pacient TBC, musí poslat vzorek zvlášť a na průvodce výrazně označit, že má být vyšetřen kultivačně či PCR na tuberkulózu. V tom případě laboratoř provede příslušné procedury
- Sérum na protilátky proti TBC také posílat nelze, protilátková odpověď je velmi špatná.

# Defilé zločinců: *Mycobacterium tuberculosis*





# Jak pátrat mykobakteriích

- Mikroskopie: Používá se Ziehl-Neelsenovo barvení
- Kultivace: Používá se speciálních půd, přičemž před vlastní kultivací předchází moření, obvykle louhem. Cílem moření je usmrtit ostatní bakterie, které by při svém rychlém růstu byly kultivačně úspěšnější. Alkalirezistentní mykobakteria moření ruče přežijí.
- Automatická kultivace: Používá se různých typů kultivačních automatů: mohou detekovat kultivační pozitivitu mnohem dříve než klasická kultivace
- Biochemické rozlišení je možné, je však vyhrazeno specializovaným laboratořím
- Pokus na zvířeti: občas se používá morče
- PCR diagnostika se stává čím dál důležitější



# Barvení dle Ziehl-Neelsena

- V prvním kroku barvíme karbolfuchsinem (Gabbetem) za horka až do výstupu par. Bez zahřívání by mykobakteria vůbec nešlo obarvit.
- V druhém kroku odbarvujeme „kyselým alkoholem“, což je směs alkoholu s minerální kyselinou, nejčastěji kyselinou chlorovodíkovou
- Ve třetím kroku dobarvujeme pozadí, tj. vše, co jsme ve druhém kroku odbarvili. Dobarvujeme **malachitovou zelení** nebo **metylenovou modří**.
- Výsledkem jsou červené acidorezistentní tyčinky na **modrém** nebo **zeleném** pozadí

# Ziehl-Neelsenovo barvení



# Kultivace mykobakterií

- Před kultivací musí být provedeno moření
- Používáme tekutou půdu Šulovu či Baničovu a vaječné půdy Ogawovu či Löwenstein-Jenssenovu. Vaječné půdy jsou tuhé vzhledem ke koagulaci vaječného bílku – neobsahují agar
- I pevné půdy se nalévají do zkumavek a uzavírají zátkou. Není to jen kvůli ohrožení personálu, ale především kvůli vyschnutí půdy.
- Výsledky se odečítají po 3, 6 a pro jistotu i 9 týdnech kultivace.



# Vzhled kolonií mykobakterií



# K tekuté Šulově půdě

- I pozitivní zkumavka je na první pohled čirá, protože nárůst mykobakterií je patrný jen u dna („modrej bordel“, jak to trefně označila studentka J. H. 😊)



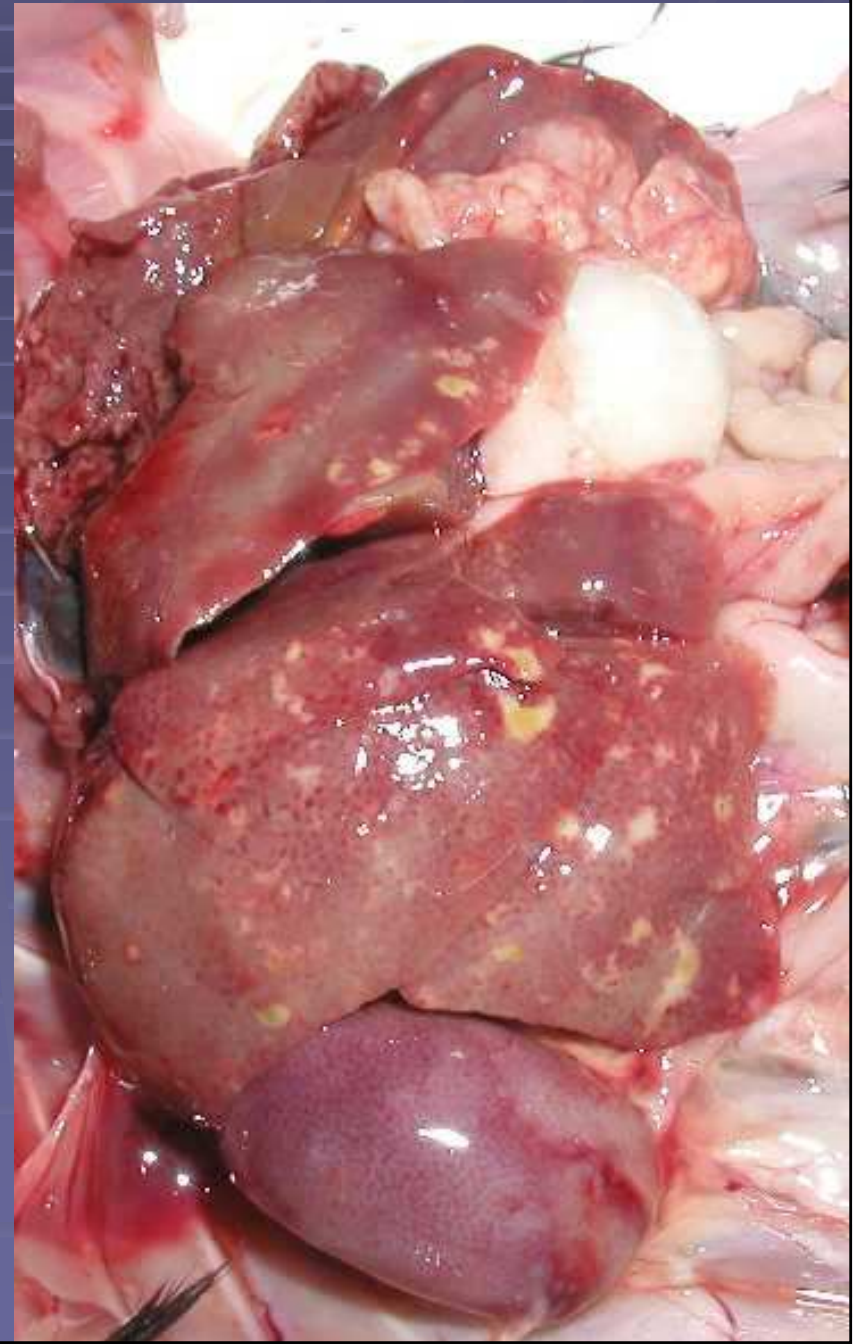
# Testy antituberkulotické citlivosti (nikoli antibiotické!)

- Nelze používat difúzní diskové testy
- Antituberkulotika přidáváme přímo do kultivační půdy
- Antituberkulotika jsou zvláštní látky, až na výjimky odlišné od antibiotik
- Vždy se užívají kombinace tří či čtyř: rychle totiž vznikají rezistence, navíc některá působí jen intra- a jiná zase extracelulárně

# Přehled běžně užívaných antituberkulotik

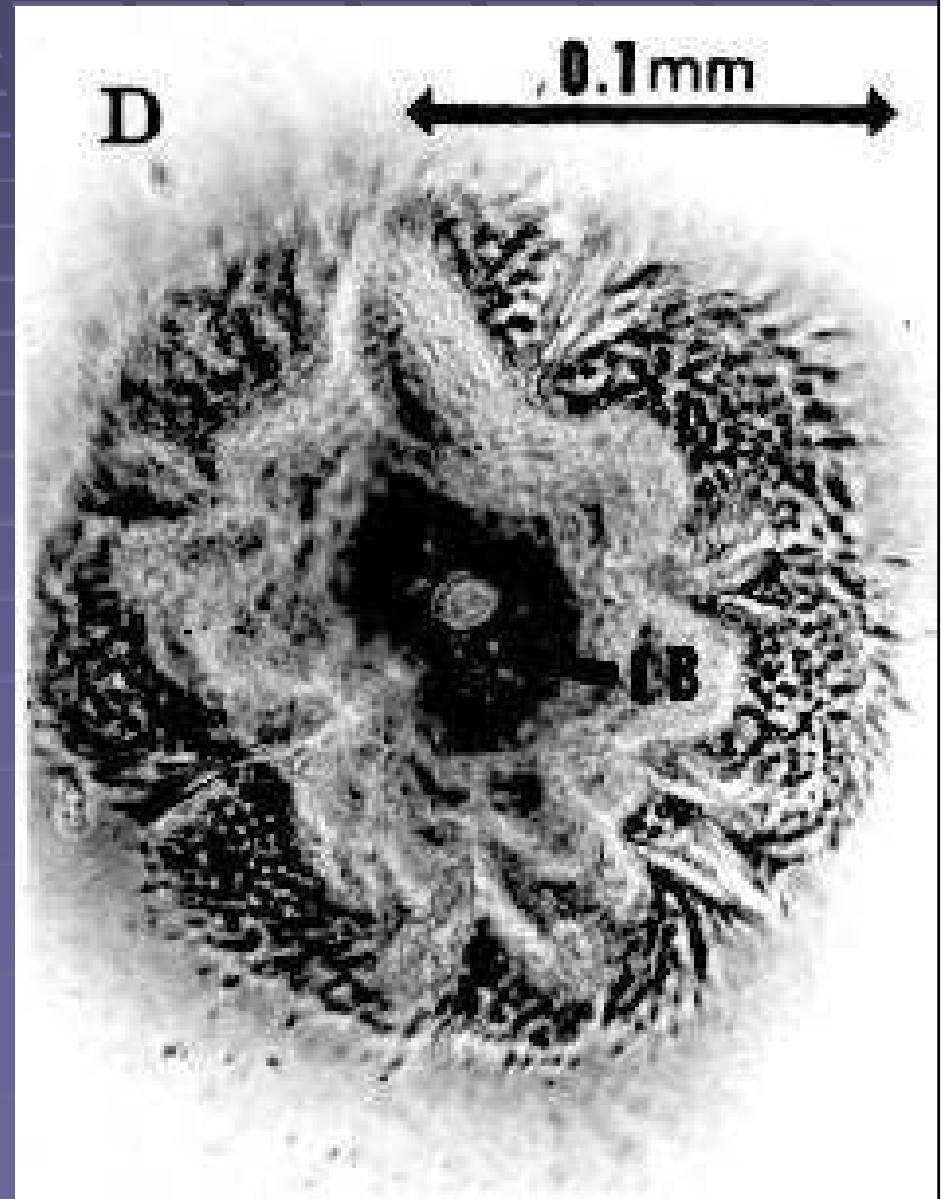
Antibiotikum	Zkratka
Isoniazid	H, INH
Ethambutol	E
Rifampicin	R
Pyrazinamid	Z
Streptomycin	S, STM

Tuberkulózní játra  
pokusného morčete



# Diagnostika nokardií a aktinomycet

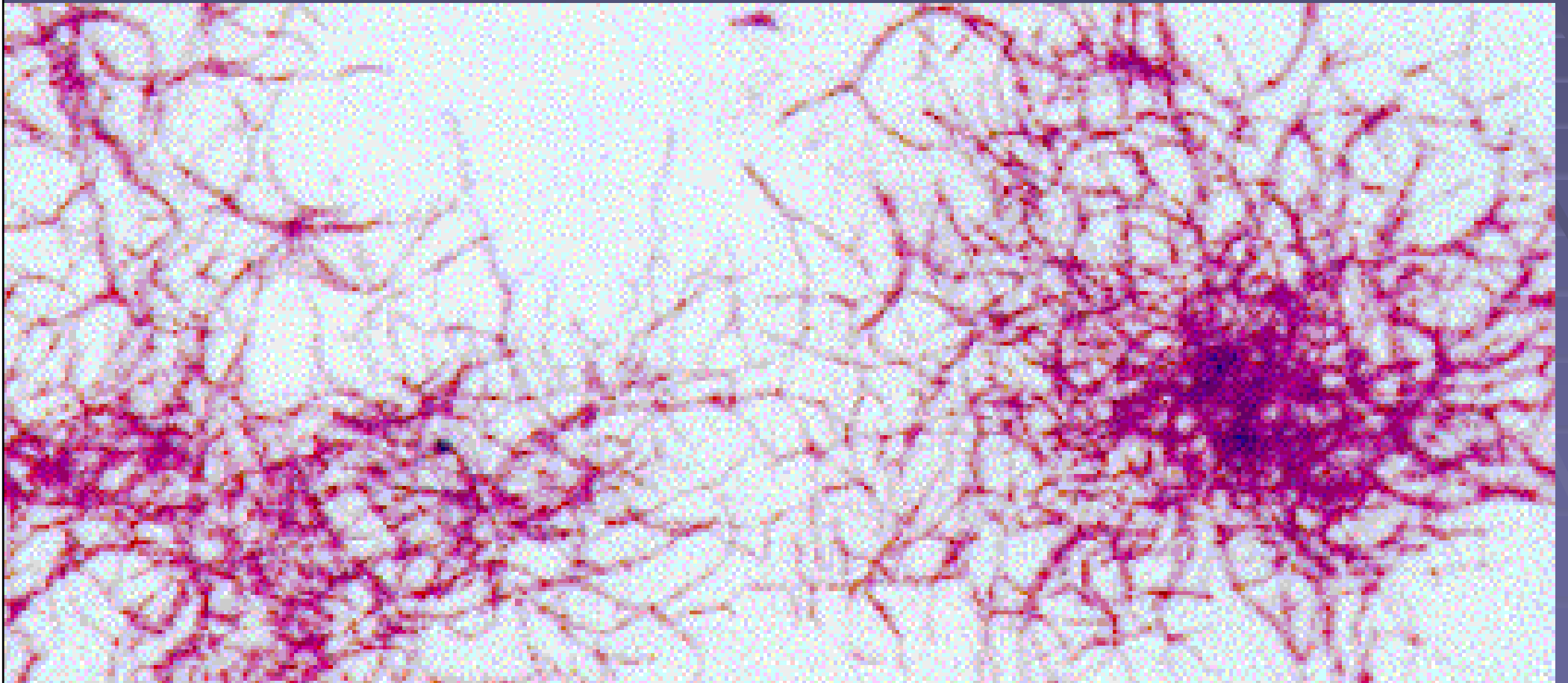
- Jsou jen částečně acidorezistentní. Barví se i podle Grama, ale poměrně špatně. Jsou to grampozitivní až gramplabilní vlákna
- Nokardie jsou aerobní, aktinomycety anaerobní





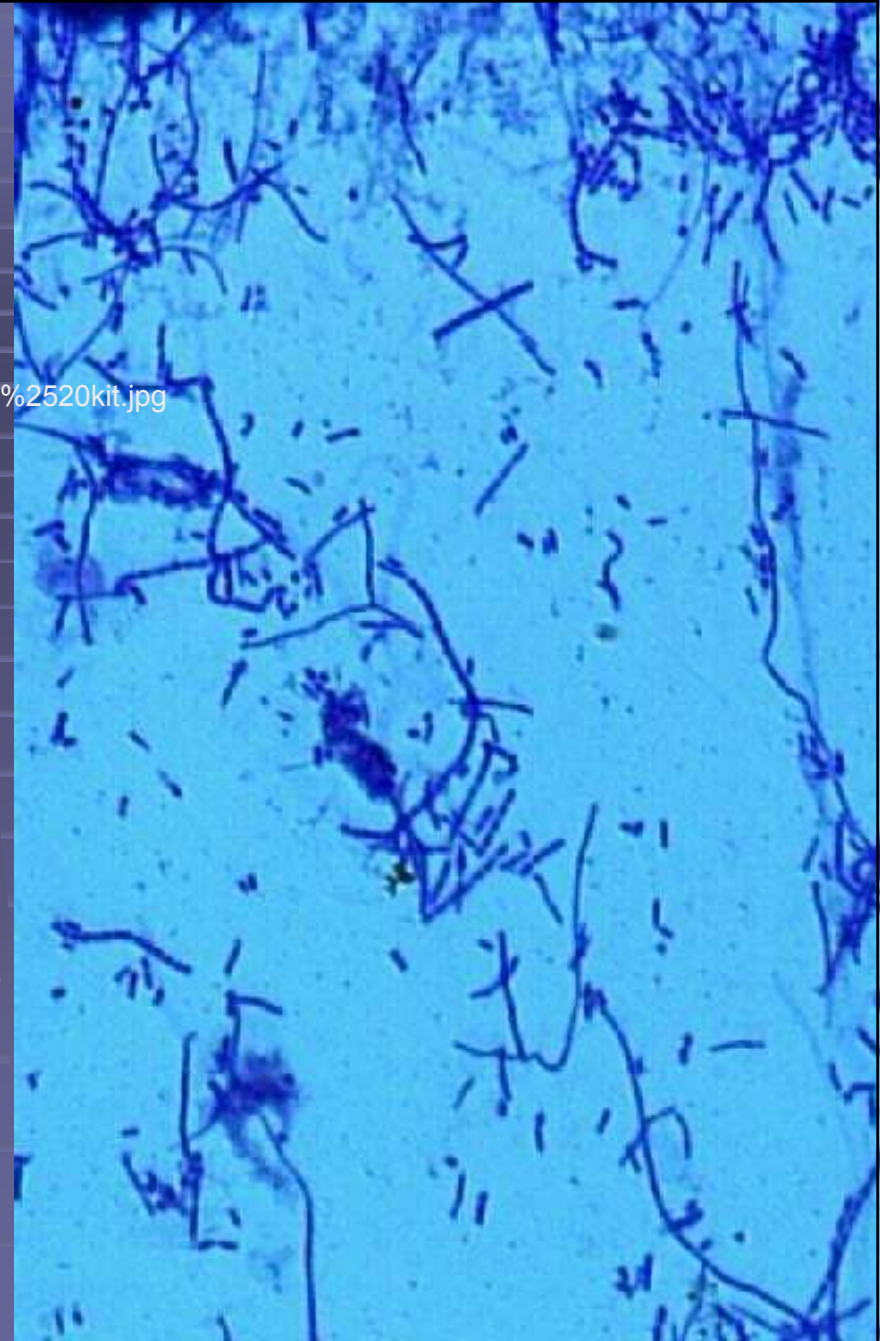
# Testy antibiotické citlivosti

- Antibiotická citlivost se na rozdíl od mykobakterií dá u nokardií a aktinomycet stanovit difusním diskovým testem. Musíme ale počítat s tím, že rostou pomalu a špatně.



# Použity obrázky z adres:

- 01-02 [www2.bc.cc.ca.us/bio16/20\\_Nervpictures.htm](http://www2.bc.cc.ca.us/bio16/20_Nervpictures.htm).
- 03 07 <http://www.health.qld.gov.au/EndoscopeReprocessing/Module13d.htm>
- 08 <http://medicineworld.org/images/blogs/mycobacterium-tuberculosis-299290.jpg>
- 09 <http://oregonstate.edu/~mahmudt/pictures/Mycobacterium%20cell%20envelope.jpg>
- 10 <http://www.cinnagen.com/images/mycobacterium%2520tuberculosis%2520diagnostic%2520kit.jpg>
- 11 [http://www.hhmi.org/news/popups/hatfull\\_jacobs20051202-esp\\_pop.html](http://www.hhmi.org/news/popups/hatfull_jacobs20051202-esp_pop.html)
- 12 13 [www.primer.ru/std/gallery\\_std2/m\\_tub.htm](http://www.primer.ru/std/gallery_std2/m_tub.htm).
- 14 <http://www.cbc.ca/story/science/national/2006/03/17/tb-who060317.html?ref=rss>
- 15 <http://www.niaid.nih.gov/dmid/tuberculosis/tbcongress/>
- 16 [www.tusalud.com.mx/120607.htm](http://www.tusalud.com.mx/120607.htm).
- 17 18 19 [sitemaker.umich.edu/medchem13/files/tb.htm](http://sitemaker.umich.edu/medchem13/files/tb.htm).
- 20 [www.bikupan.se/tuberculosis/tuberc.html](http://www.bikupan.se/tuberculosis/tuberc.html).
- 21 [textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html](http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html)
- 22 <http://www.stockmedicalart.com/medicalartstudio/kfolio/images/tuberculosis.jpg>
- 23 [http://www.lung.ca/tb/images/full\\_archive/138\\_infection\\_stages.gif](http://www.lung.ca/tb/images/full_archive/138_infection_stages.gif)
- 24 [tuberculosis.upmc.com/](http://tuberculosis.upmc.com/).
- 25 <http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/images/d7124.jpg>
- 26 <http://en.wikipedia.org/wiki/Actinomyces>
- 27 [http://rbp.fmrp.usp.br/didatico/microbiologia/Micologia\\_files/image087.gif](http://rbp.fmrp.usp.br/didatico/microbiologia/Micologia_files/image087.gif)
- 28 [http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol\\_4684/Microbes/nocardia.jpg](http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Microbes/nocardia.jpg)
- 29 [http://www.appliedradiology.com/Documents/Cases/images/Pugatch\\_Figure04B.jpg](http://www.appliedradiology.com/Documents/Cases/images/Pugatch_Figure04B.jpg)
- 30 - 31 <http://www2.mf.uni-lj.si/~mil/bakt4/bakt4.htm>



Logo jednoho  
kongresu o TBC



Děkuji za pozornost