

Jméno:

Kruh:

Datum:

## Téma P08: Laboratorní diagnostika tuberkulózy, aktinomycet a nokardií

### Úkol 1: Mikroskopie acidorezistentních a částečně acidorezistentních mikroorganismů

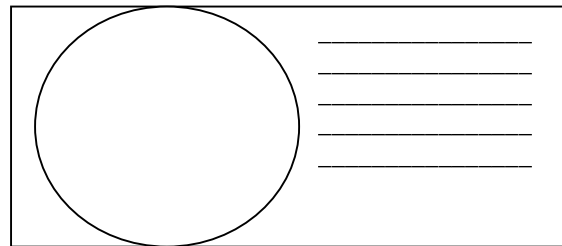
Zatímco acidorezistentní mikroorganismy (*Mycobacterium*) nelze barvit dle Grama, mikroby acidorezistentní pouze částečně (*Actinomyces*, *Nocardia*) mohou být gramem obarveny, ale barví se nekonstantně, a také nabývají větvených filamentózních forem.

#### a) Barvení (negativního) klinického materiálu barvicí metodou dle Ziehl-Neelsena

Ziehl-Neelsenovo barvení se používá u mykobakterií (*M. tuberculosis*, *M. leprae*), ale také u některých parazitů (*Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayentanensis*). Acidorezistentní organismy se barví pouze při zahřátí, zato je pak neodbarví ani kyselý alkohol (alkohol s minerální kyselinou). Poté je odbarvené pozadí obarveno kontrastní barvou.

Obarvěte vzorek sputa dle Ziehl-Neelsena (varianta s methylenovou modří). Mikroskopujte. Zde acidorezistentní tyčinky nenaleznete. Zakreslete výsledky, uvidíte především přirozené pozadí, tj. leukocyty, epitelie a další objekty. Nezapomeňte obrázek popsat (za použití řádků vedle obrázku).

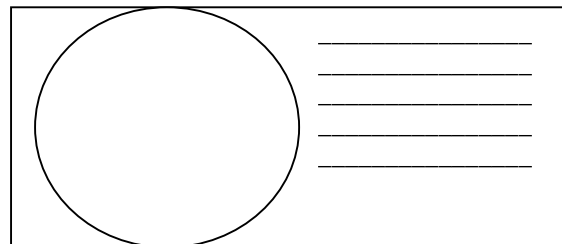
Popište také barvicí proceduru – do následující tabulky zapište názvy činidel používaných při barvení.



1.	Během barvení se preparát _____, dokud _____		
2.	Činidlo je směsí _____	_____ a _____	
3.	Místo tohoto barviva lze použít také _____	_____	

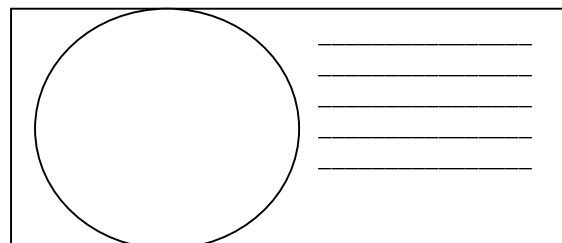
#### b) Mikroskopie mykobakteriální kultury

Prohlédněte si v mikroskopu (imerze, imerzní objektiv) mykobakteriální kulturu barvenou dle Ziehl-Neelsena. Zaznamenejte zejména přítomnost acidorezistentních tyček. Pozorování zakreslete. Nezapomeňte obrázek popsat (za použití řádků vedle obrázku).



#### c) Mikroskopie kmenů aktinomycet a nokardií

Prohlédněte si mikroskopicky dle Grama barvené sklíčko. Popište a zakreslete pozorované objekty. Povšimněte si velkého polymorfizmu organismů (od kokovitého tvaru přes tyčinky až po vlákna, často větvená); grampozitivní, ale často až gramlabilní).



Jméno:

Kruh:

Datum:

**Úkol 2: Kultivace mykobakterií, aktinomycet a nokardií**

Kultivační nároky acidorezistentních a částečně acidorezistentních bakterií jsou velmi různorodé.

- Pro *Mycobacterium tuberculosis* používáme tekuté (Šula) a pevné půdy (Ogawa, Löwenstein-Jenssen). Pevné půdy se liší od většiny půd používaných v bakteriologii, protože neobsahují agar; jejich „pevnost“ je dána koagulovanou vaječnou bílkovinou. Před kultivací je nutno vzorky mořit.
- Pro rod *Nocardia* postačuje běžný krevní agar.
- Pro rod *Actinomyces* je nutný VL-agar a kultivace v anaerostatu či anaerobním boxu (viz P07), protože jsou anaerobní.

**a) Popiště půdy pro kultivaci mykobakterií**

Název půdy	tekutá/pevná	barva	poznámky

**b) Popiště a zakrstele růst kolonií rodů *Mycobacterium*, *Actinomyces* a *Nocardia* na (v) daných médiích**

Baktérie	Název půdy	Přítomnost/nepřítomnost růstu, případně charakterizace růstu (charakterizujte růst vlastními slovy)
<i>Mycobacterium</i>		
<i>Actinomyces</i>	krevní agar	
	VL agar	
<i>Nocardia</i>	krevní agar	
	VL agar	

**Úkol 3: Určení citlivosti na antimikrobiální látky**

K léčbě mykobakteriálních infekcí se používají speciální léky zvané antituberkulotika. Liší se také způsob testování citlivosti: antituberkulotika se přímo přidávají do půdy. Infekce působené rody *Actinomyces* a *Nocardia* se léčí „normálními“ antibiotiky a citlivost se testuje „normálním“ difuzním diskovým testem.

**a) Určení citlivosti mykobakterií na antituberkulotika**

Porovnáním s kontrolní zkumavkou odečtěte testy citlivosti kmenů mykobakterií na antituberkulotika.

Antituberkulotikum					Pozitivní kontrola
Růst A/N					
Interpretace					

**b) Citlivost na antibiotika u kmenů *Nocardia* a *Actinomyces***

Proveďte *in vitro* testování citlivosti na antibiotika u nokardií a aktinomycet. Na stole naleznete difusní diskové testy. Do tabulky dopište zkratky antibiotik dle přiložené kartičky a pro všechny testované kmeny změřte zóny

Jméno:

Kruh:

Datum:

citlivosti. Na kartičce máte napsány hraniční zóny – podle nich interpretujte zóny vámi zjištěné jako citlivé (C), rezistentní (R) a dubiózní (D).

Kmen →				
Antibiotikum (celé jméno)	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace

### Úkol 4: PCR v diagnostice TBC

Jelikož je kultivace mykobakterií obtížná, stává se PCR velmi důležitou diagnostickou metodou. Odečtete výsledek PCR TBC (z prezentace), zapište a interpretujte výsledky.

Pacient č.	Proužek vzorku	Interní kontrola	Interpretace
1			
2			
3			
4			

### Kontrolní otázky:

1. Jaké vzorky se odebírají při podezření na TBC?
2. Jak dlouho trvá kultivace *M. tuberculosis*?
3. Proč je nutné moření před kultivací *M. tuberculosis*?
4. Za jakých podmínek a jak dlouho rostou aktinomycety a nokardie?
5. Z jakého důvodu se v diagnostice TBC prosazuje automatická kultivace?
6. Jak by ve čtvrtém úkolu vypadala „inhibice reakce“, a jak by se takový výsledek interpretoval?