

Téma P08+09: Laboratorní diagnostika tuberkulózy a infekcí způsobených aktinomycetami, nokardiemi a spirochetami

Ke studiu: *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira* (učebnice, WWW atd.)

Z jarního semestru: Mikroskopie, kultivace, antimikrobiální citlivost, PCR, metody průkazu protilátek

Ú 08/1: 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 cayetanensis*). Acidorezistentní organismy se barví pouze při zahřátí, avšak zato je pak neodbarví ani kyselý alkohol (alkohol s minerální kyselinou). Poté je odbarvené pozadí obarveno kontrastní barvou.

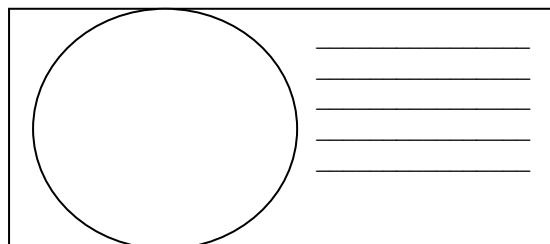
Z časových důvodů nebudete barvení provádět. Popište však alespoň barvicí proceduru – do následující tabulky запиšte názvy činidel používaných při barvení

1.	Během barvení se preparát _____, dokud _____	
2.	Činidlo je směsí _____ a _____	_____ 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 tyčinek. Zakreslete pozorované.

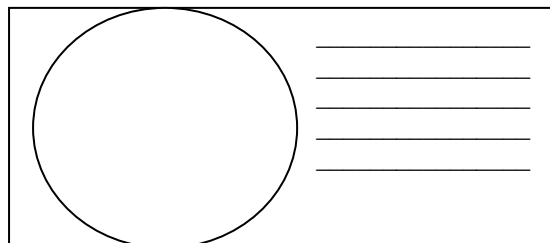
Nezapomeňte obrázek **popsat** (za použití řádků vedle obrázku).



c) Mikroskopie kmenů aktinomycet a nokardií

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

Opět obrázek i **popište**.



Úkol 08/2: 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 mořiti.
- ❖ 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) Popište půdy pro kultivaci mykobakterií

Název půdy	tekutá/pevná	barva	poznámky

b) Popište a zakreslete 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 08/3: 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. Zato infekce působené rody *Actinomyces* a *Nocardia* se léčí „normálními“ antibiotiky a citlivost se testuje „normálním“ difusním diskovým testem.

a) Určení citlivosti mykobakterií na antituberkulotika

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

Antituberkulotikum				Kontrola růstu
Růst A/N				
Interpretace				

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

Z časových důvodů se neprovádí. Odečítalo by se jako běžné difusní diskové testy u jakékoli jiné bakterie.

Úkol 08/4: PCR v diagnostice TBC


Jelikož je kultivace mykobakterií obtížná, stává se PCR velmi důležitou diagnostickou metodou.

Odečtete výsledek PCR TBC (z prezentace), запиšte a interpretujte výsledky

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

Úkol 08/5: Diagnostika lepry

Lepra je nemoc, která stále postihuje miliony lidí v méně rozvinutých zemích. Její diagnostika je obtížná. Vyplňte následující tabulku.

	Toto zvíře se jmenuje	
	Používá se k výrobě	
	a tato látka se používá při	

Zdroj obrázku: http://www.1-costaricalink.com/costa_rica_fauna/nine_banded_armadillo.htm

Lymeská borrelióza

Společná tabulka pro úkoly 09/1, 2 a 3

Písmeno pacienta	Krátký klinický popis (1–3 slova charakterizující situaci)	ELISA (Úkol 09/1)				W. blot (Ú09/2)		PCR (Ú09/3) (+/-)	Závěr: konečná interpretace, dopor. případné léčby
		IgM		IgG		IgM (+/-)	IgG (+/-)		
		Abs.	(+/-)	Abs.	(+/-)				
J									
K									
L									
M									
N									

Úkol 09/1: Průkaz protilátek proti *Borrelia garinii* metodou ELISA

Odečtete podle výkladu vyučujícího výsledek reakce u pacientů s podezřením na lymeskou borreliózu. Určujeme protilátky ve třídě IgG a IgM. V poli A1 (odpovídá důlku A1 v mikrotitrační destičce) naleznete hodnotu CAL (hraniční hodnotu; všechny hodnoty absorbance nad CAL jsou pozitivní, vše pod CAL budiž negativní). V polích B1 a C1 jsou kontroly. Pacienti označení písmeny J až N jsou v barevně označených polích. Zapište hodnotu CAL, zkontrolujte, jestli negativní a pozitivní kontrola je v pořádku. Pak odečtete a vyhodnoťte výsledky ELISA reakce pro pacienty No. J, K, L, M, N (ty nepište sem, použijte hlavní tabulku nahoře).

Hodnota CAL (důlek A1):		Hodnota absorbance K+ (důlek B1):		<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	← zaškrtněte, co platí
IgM		Hodnota absorbance K- (důlek C1):		<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	
Hodnota CAL (důlek A1):		Hodnota absorbance K+ (důlek B1):		<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	← zaškrtněte, co platí
IgG		Hodnota absorbance K- (důlek C1):		<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	

Úkol 09/2: Průkaz protilátek proti *Borrelia garinii* pomocí Western blotu

U pacientů řešených v úkolu č. 1 se vzorky séra či likvoru testovaly také Western blotem. Odečtete výsledky dle instrukcí. Pro odečtení reakce použijte kontrolní proužek. Diagnostické schéma je vždy stejné: ELISA je použita ke screeningu, Western blot ke konfirmaci jejich výsledků. Odečtete Western blot u pacientů J až N a zapište výsledky do hlavní tabulky.

Úkol 09/3: Diagnostika Lymeské borreliózy pomocí PCR

Pomocí dané fotografie PCR produktu na agarózovém gelu zakreslete a zaznamenejte který z testovaných vzorků je pozitivní. Poté proveďte celkové zhodnocení všech tří úkolů a zapište závěr.

Syfilis

Původce syfilis, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, NENÍ kultivovatelný organismus. Diagnostika závisí na stádiu nemoci.

Úkol 09/4: Přímý průkaz syfilis.

Přímý průkaz syfilis je možný pouze v případě zaslání vhodných vzorků do laboratoře. V některých stádiích nemoci však není k mání žádný vhodný vzorek pro tento účel.



a) Rabbit infectivity test – RIT

Zapište název králíka používaného pro tento test.

(Je odvozen z tohoto souostrovní: →→→→→→→→→→.)

Exudát z podezřelého vředu je zpravidla vyhodnocován zástinovou mikroskopií a očkován do králíčích varlat.

Testované zvíře začíná trpět orchitidou 10 dní po naočkování. Název králíka:

b) Mikroskopie v zástině

Podívejte se na mikrofotografii treponemat ze zástinové mikroskopie. Pro urychlení máte tento úkol již vyplněn.

c) Přímá imunofluorescence

Pro urychlení máte i tento úkol už vyplněn.



Nepřímý průkaz syfilis

Společná tabulka pro úkoly 09/5 a 09/6.

Písmeno pacienta	Krátká klinická charakterizace případu	Úkol 09/5 screening		Úkol 09/6 konfirmace				Závěr: konečná interpretace, doporučení případné léčby	
		RRR	TPHA	ELISA		WB			
				FTA-ABS	IgM	IgG	IgM (+/-)		IgG (+/-)
A									
B									
C									
D									
E									

Úkol 09/5: Screening syfilis – RRR a TPHA

Těhotné ženy a dárce krve jsou screeningově vyšetřováni rychlou reaginovou reakcí (RRR) a *Treponema pallidum* pasivní hemaglutinací (TPHA). Posuďte výsledky screeningu u předložené skupiny osob a stanovte, u koho je třeba ještě zajistit podrobnější, tzv. konfirmační (potvrzovací) vyšetření. Výsledky запиšte přímo do tabulky.

RRR: pozitivní je vyvločkování. TPHA: pozitivní je tvorba aglutinátu. Více viz praktikum J07.

Úkol 09/6: Konfirmace syfilis – FTA-ABS, ELISA a Western blotting

Vyhodnoťte výsledky FTA-ABS, ELISA a western blottingu (WB) u pacientů se suspektní syfilis (viz předchozí úkol). Spočítejte cut-off a porovnejte s ním hodnoty pozitivní a negativní kontroly a výsledky pacientů.

V poli/důlku A1 je přítomen blank.

Hodnota cut off (C1 + D1) / 2		Hodnota absorbance K- (pole/důlek B1):	<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	← zaškrtněte, co platí
IgM		Hodnota absorbance K+ (pole/důlek E1):	<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	
Hodnota cut off (C1 + D1) / 2		Hodnota absorbance K- (pole/důlek B1):	<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	← zaškrtněte, co platí
IgG		Hodnota absorbance K+ (pole/důlek E1):	<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	

Leptospiróza

Úkol 09/7: Přímý průkaz *Leptospira* sp.

Prohlédněte si morfologii leptospir kultivovaných na tekutém Korthoffově médiu po dva týdny. Pro test byla použita moč pacienta s podezřením na leptospirózu. Pro urychlení

