

Téma XP07–8: Diagnostika anaerobních bakterií, tuberkulózy, aktinomycet a nokardií

Ke studiu: *Clostridium*; nesporulující anaeroby (učebnice, WWW atd.), *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Nocardia* (učebnice, WWW atd.)

Z jarního semestru: Mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace, pokus na zvířeti, neutralizace, antimikrobiální citlivost, PCR

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.

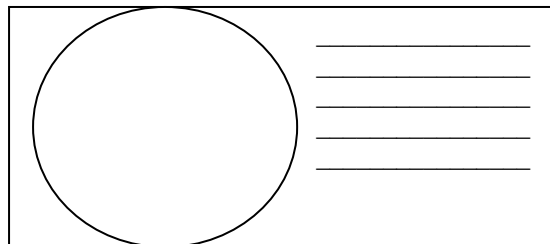
a) Barvení (negativního) klinického materiálu barvicí metodou dle Ziehl-Neelsena

Ziehl-Neelsenovo barvení se používá u mykobakterií (*M. tuberculosis*, *M. leprae*), ale také u některých parazitů (*Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*). Acidorezistentní organismy se barví pouze při zahřátí*, avšak zato je pak neodbarví ani tzv. „kyselý alkohol“ (roztok alkoholu s HCl nebo H₂SO₄). Poté je odbarvené pozadí obarveno kontrastní barvou.

Obarvěte negativní vzorek sputa de 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 запиšte názvy činidel používaných při barvení

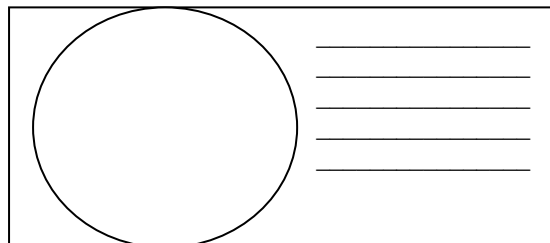
1.	Během barvení se preparát _____, dokud _____	
2.	Činidlo je směsí _____	_____ a _____
3.	Místo tohoto barviva lze použít také _____	_____



b) Mikroskopie mykobakteriální kultury

Prohlédněte si v mikroskopu (imerze, imerzní objektiv) mykobakteriální kulturu barvenou dle Ziehl-Neelsena. Zaznamenejte zejména přítomnost acidorezistentních tyčinek. Zakreslete pozorované.

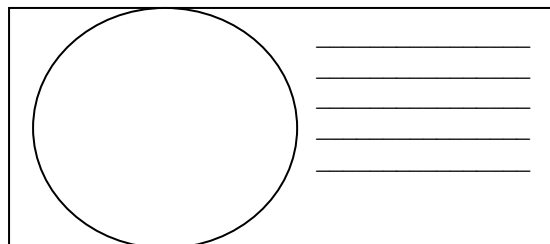
Nezapomeňte obrázek **popsat** (za použití řádků vedle obrázku).



c) Mikroskopie kmenů aktinomycet a nokardií

Prohlédněte si mikroskopicky Gramem barvené skličko. 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 2: Kultivace mykobakterií, aktinomycet a nokardií

Kultivační nároky acidorezistentních a částečně acidorezistentních bakterií jsou velmi různorodé.

- ❖ Pro *Mycobacterium tuberculosis* používáme tekuté (Šula, Banič) 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, případně mikroaerofilní, ale s tak malou potřebou kyslíku, že jim toto vyhovuje.

*Zahřátí lze případně nahradit použitím vysoce koncentrovaného karbolfuchsinu a vysoce koncentrovaného fenolu; tato modifikace Ziehl-Neelsenova barvení (dle Kinyouna) nevyžaduje zahřívání.

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 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*

Testování citlivosti na antibiotika u nokardií a aktinomycet se provádí klasickým difusním testem, ovšem kvůli růstovým vlastnostem těchto bakterií používáme půdy s krví. V tomto spojeném praktiku testy citlivosti neprovádíme.

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			

Úkol 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

Úkol 6: Nepřímý průkaz TBC pomocí testu QUANTIFERON®-TB Gold

Jde o test vyšetření indukovaného uvolňování interferonu gama k ověření buněčné imunity. Princip testu: Bylo prokázáno, že při tuberkulóze, a to i latentní, dochází k tomu, že tuberkulózní antigeny aktivují T-lymfocyty a ty tvoří velká množství interferonu gama. Podobně lze tyto T-lymfocyty aktivovat nespecificky např. takzvaným mitogenem, ten se proto používá jako pozitivní kontrola (MIT). Jako negativní kontrola je použita zkumavka, která nic neobsahuje (NIL). Hodnota „TB“ představuje množství uvolněného interferonu po stimulaci vlastním antigenem TBC. Samotný interferon je přítom detekován pomocí reakce ELISA.

Interpretujte vyšetření testem Quantiferon-TB Gold u čtyř pacientů s využitím interpretační tabulky.

Anna: MIT = 4,8 TB = 1,2 NIL = 1,1 Vaše interpretace: _____

Berta: MIT = 5,3 TB = 4,8 NIL = 2,1 Vaše interpretace: _____

Cecil: MIT = 0,9 TB = 0,9 NIL = 0,8 Vaše interpretace: _____

Dimos: MIT = 8,4 TB = 8,3 NIL = 8,2 Vaše interpretace: _____

(všechny hodnoty jsou uvedeny IU/ml)

Interpretační tabulka (podle doporučení k testu, zjednodušeno!)

NIL	TB mínus NIL	MIT mínus NIL	Konečná interpretace testu	Přítomnost infekce <i>M. tuberculosis</i>
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	negativní	Nepravděpodobná
	≥ 0,35	jakákoli hodnota	pozitivní	Pravděpodobná
> 8,0	< 0,35	< 0,5	nejistá	Nelze určit
	jakákoli hodnota	jakákoli hodnota		

Tabulka pro hlavní výsledky úkolů 1 až 4 (k postupnému vyplnění):

Kmen	K	L	M	N
Gramovo barvení – Úkol 1b (včetně případných údajů o tvorbě spor)				
Kultivace: úkol 3	Krevní (“KA”) Růst A/N			
	VL agar (“VLA”) Růst A/N			
	VL bujón Růst A/N			
	Popis kolonií na KA/VLA*			
KONEČNÝ ZÁVĚR (výsledek Úkolu 4 – ANAEROtest, nebo, u „ne-anaerobů“, výsledky předchozích testů)				

*Použijte VLA (VL agar) u bakterií, které nerostou na krevním agaru

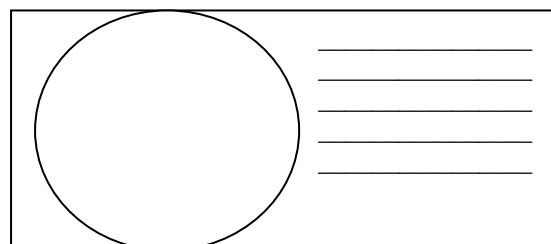
Úkol 11: Mikroskopie klinického vzorku a mikroskopie kmene

a) Prohlídka klinického vzorku

Prohlédněte si Gramem barvený preparát.

Pravděpodobně najdete směs různých bakterií, jak je to u anaerobních infekcí typické: za infekci nemůže jeden patogen, ale směs patogenů. Vedle bakterií můžete vidět leukocyty (zejména polymorfonukleární), případně epitelie, tkáňovou drť a tak dále.

Nezapomeňte obrázek **popsat** (použijte čáry)!



b) Mikroskopie podezřelých kmenů

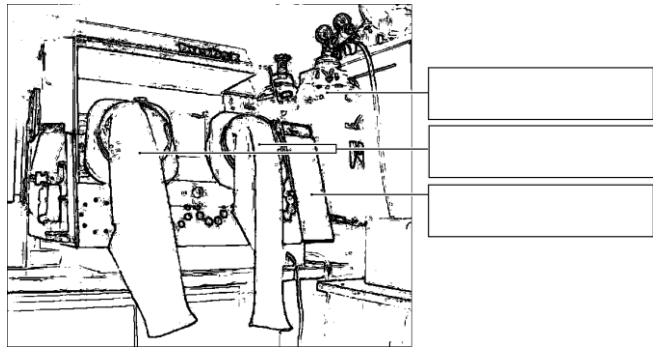
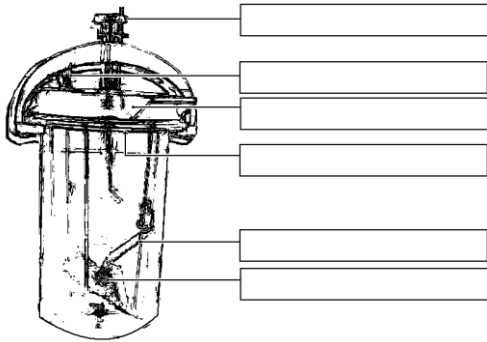
Anaerobní bakterie mohou být koky i tyčinky, grampozitivní i gramnegativní; v tom se neliší od jiných bakterií. Bývají ale pleomorfnější. U rodu *Clostridium* je přítomnost a pozice endospor užívána jako významný diagnostický znak. Pokuste se u jednoho z vašich kmenů (robustní G+ tyčinky) endosporu najít.

Úkol 12: Anaerostat a anaerobní box

K získání anaerobiózy používáme v naší laboratoři tři způsoby:

- pro tekuté půdy se jako bariéra médium/atmosféra používá **parafinový olej** (není dokonalé)
- pevné půdy dáváme do **anaerostatu**, kde je kyslík chemicky nahrazen směsí plynů
- pevné půdy lze také umístit do **anaerobního boxu**; anaerobní atmosféra je vhnána z bomby.

Vepište do obrázků svůj popis (anaerostat uvidíte doopravdy a spolu s anaerobním boxem také na obrázku).



Úkol 13: Kultivace na agarových půdách

Popište kultivační výsledky daných kmenů na aerobních i anaerobních půdách.

a) Aerobní kultivace na krevním agaru (KA)

Napište, zda bakterie rostou či nikoli, případně též popište jejich kolonie.

b) Anaerobní kultivace na VL agaru (VL krevním agaru)

VL (krevní) agar je podobný krevnímu agaru, ale má snížený redoxní potenciál a kultivuje se v anaerostatu či anaerobním boxu. Napište, které kmeny zde rostou a ty, které nerostly na KA, popište.

c) Pomnožení anaerobů ve VL bujónu

VL bujón se používá pro pomnožení málo početných anaerobních bakterií. Zkontrolujte přítomnost zákalu (růstu) ve VL bujónu a porovnejte s výsledky části b).

Úkol 14: Druhá diagnostika anaerobů biochemickými testy

U kmenů určených jako anaeroby používáme biochemický mikrotest (ANAEROTest 23 Erba-Lachema) naočkovaný o dva dny dříve. Vzhledem k tomu, že způsob odečítání odpovídá odečítání NEFERMtestu 24 (snad s výjimkou toho, že výsledek je těžší najít v kódové knize, která je rozdělena na čtyři části), není nutné zařadit jeho odečet do tohoto spojeného praktika. **Do výsledku tabulky tedy zapíšeme pouze „G– anaerobní tyčinky“ či „G+ spirálující tyčinky“ bez rodového a druhového určení.**

Úkol 15: Citlivost anaerobů na antibiotika

Odečtete E-test na anaerobní bakterii. Zakreslete a vyhodnoťte výsledek.

Nezapomeňte, že i když je principiálně podobný jako difusní diskový test, je E-test kvantitativním testem. Hodnoty koncentrací jsou napsány přímo na proužku. Místo, kde okraj zóny kříží proužek, nám ukazuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC).

	Testovaný kmen
	Testované antibiotikum / antimykotikum
	Hodnota MIC
	Breakpoint:
Závěr (kmen je citlivý/rezistentní k danému antibiotiku)	

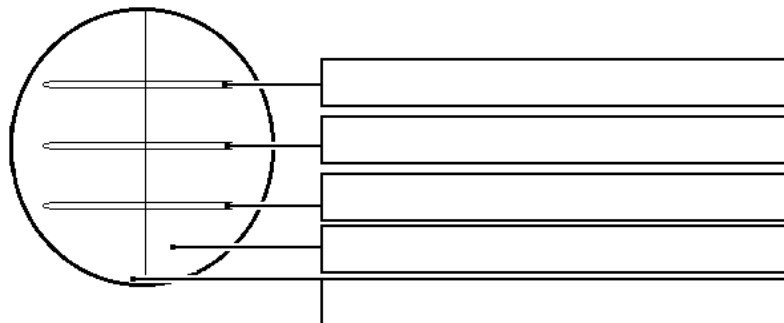
Poznámka k Úkolu 15: *Anaerobní bakterie bývaly testovány difusním diskovým testem, avšak bylo prokázáno, že difusní diskový test není pro anaerobní bakterie dostatečně spolehlivý. V současnosti se dle instrukcí EUCAST se infekce způsobené anaerobními bakteriemi buďto léčí bez in vitro testování, nebo, zvláště u závažných infekcí, se k in vitro testování používají E-testy.*

Úkol 16: Detekce toxinů klostridií

U klostridií se používají různé testy produkce toxinu.

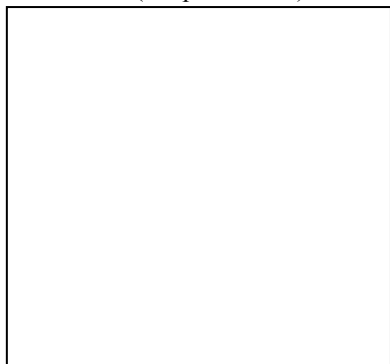
a) Průkaz toxinu (lecitinázy) *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens tvoří specifickou lecitinázu, neutralizovatelnou specifickou protilátkou. Polovina vaší misky je potřena protilátkou (anti-lecitinázou), druhá potřena není. Toxický efekt lecitinázy spatříte jako oblast precipitace kolem kmene na žlutkovém agaru. Pravý toxin je neutralizován antitoxinem, jiné lecitinázy neutralizovány nejsou. Zakreslete výsledek do obrázku a přičiňte popis.



b) Průkaz toxinu *Clostridium tetani*

Zakreslete (dle prezentace) obrázek tetanické myši. Povšimněte si pozice ocásku a končetin.



c) Detekce A a B toxinů *Clostridium difficile*

Pseudomembranózní kolitida způsobená toxiny *Clostridium difficile* je velmi nebezpečná, zejména u hospitalizovaných pacientů. Testování se provádí imunochromatografickým testem, který již byl prováděn v praxi J09. Pro praxi je důležité, že na toto vyšetření je nutno zasílat kusovou stolicí (NESTACÍ výtěr z řiti). Prohlédněte výsledek průkazu toxinů A + B *Clostridium difficile* ve vzorcích stolice X a Y a zapište výsledky:

Vzorek X je pozitivní – negativní

Vzorek Y je pozitivní – negativní