

Téma P08: Laboratorní diagnostika tuberkulózy, aktinomycet a nokardií

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

Z jarního semestru: Mikroskopie, kultivace, antimikrobiální citlivost, PCR

Úkol 1: Mikroskopie acidorezistentních a částečně acidorezistentních mikroorganismů

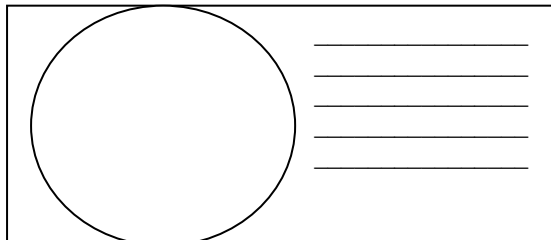
Zatímco acidorezistentní mikroorganismy (*Mycobacterium*) nelze barvit dle Grama, mikroby acidorezistentní pouze částečně (*Actinomyces*, *Nocardia*) mohou být Gramem obarveny, ale barví se nekonstantně, a také nabývají větvených filamentózních forem.

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

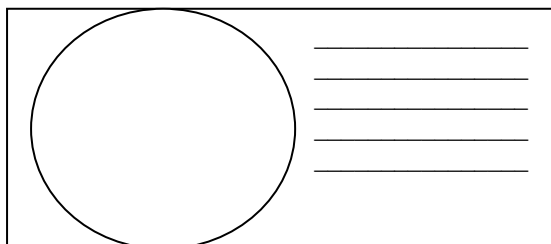


1.	Během barvení se preparát _____, dokud _____	
2.	Činidlo je směsí _____	_____ a _____
3.	Místo tohoto barviva lze použít také _____	_____

b) Mikroskopie mykobakteriální kultury

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

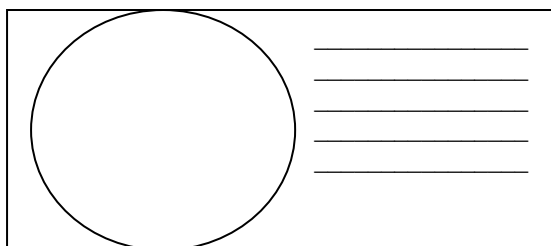
Nezapomeňte obrázek **popsat** (za použití řádků vedle obrázku).



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*

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 citlivosti. Na kartičce máte napsány hraniční zóny – podle nich interpretujte zóny vámi zjištěné jako citlivé (C) či rezistentní (R). „Intermediární“ interpretace v tomto případě nemáme.

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 interpretejte 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 nescificky 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.

Interpretejte 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		