



# **Acidorezistentní bakterie praktikum č. 8**

Lékařská mikrobiologie – cvičení  
Mikrobiologický ústav LF MU

# Obsah cvičení

---

- ▶ Co je acidorezistence?
- ▶ Rod *Mycobacterium*
- ▶ *Actinomyces spp.*, *Nocardia spp.*



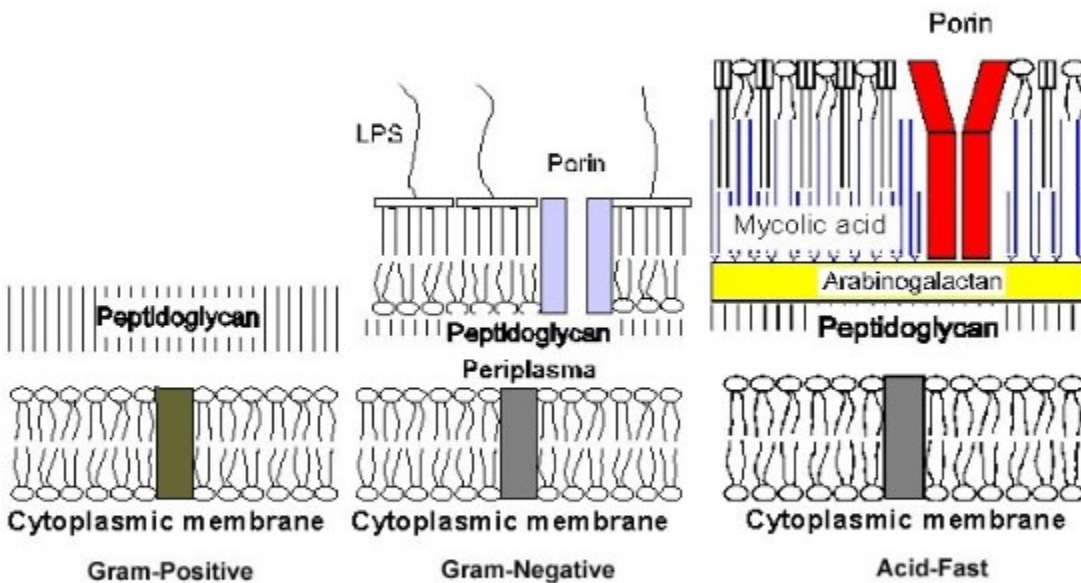
# Acidorezistence (1)

---

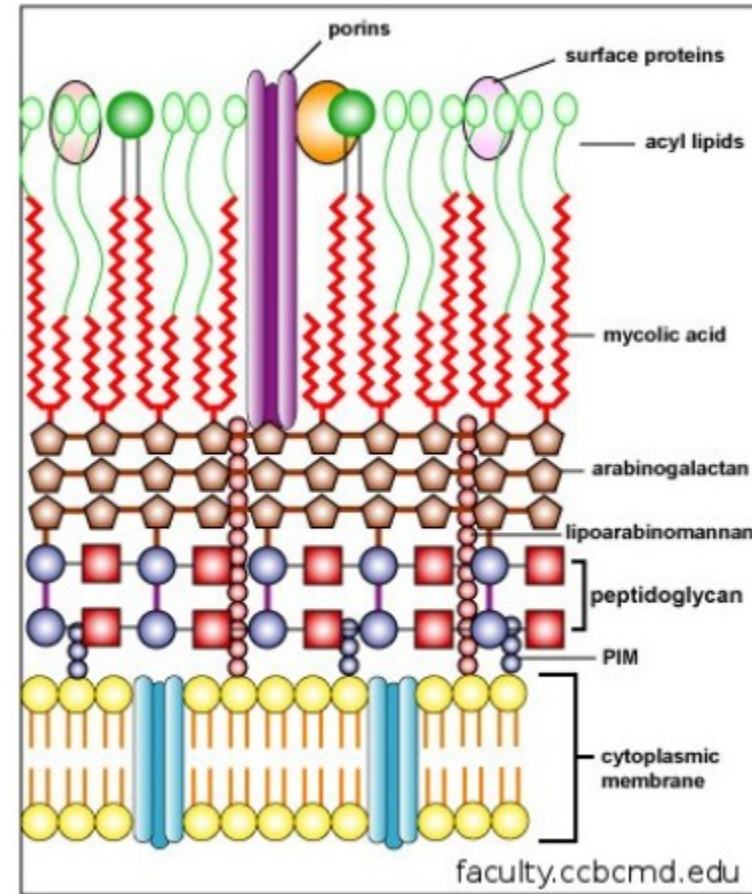
- ▶ Odlišná stavba buněčné stěny acidorezistentních bakterií vs. G+ a G-.
- ▶ **Vysoký obsah lipidů a mykolových kyselin** → buněčná stěna je silně **hydrofobní** → nelze ji barvit běžnými organickými (hydrofilními) barvivy.
- ▶ Stavba BS zaručuje také **vysokou odolnost** ke kyselinám, zásadám a alkoholům.
- ▶ Acidorezistentní tedy nebarvíme Gramem, ale **Ziehl-Neelsenovým** barvením.
- ▶ **Plně acidorezistentní**: mykobakterie
- ▶ **Částečná acidorezistence**: aktinomycety, nokardie



# Acidorezistence (2)



from <http://wbtd15.biozentrum.uni-wuerzburg.de/homepage/Forschung/Theorie/Benz/Zellwand.html>



faculty.ccbcmd.edu

# Rod *Mycobacterium*

---

- ▶ Aerobní G+(dle taxonomie), netvoří spory, nepohyblivé.
  - ▶ Acidorezistentní, alkalorezistentní.
  - ▶ Mají velmi dlouhou generační dobu (až 24 hodin, ostatní bakterie cca 30 minut) → kultivace probíhá až v řádu týdnů.
  - ▶ Velmi odolné vůči vyschnutí a dezinfekčním látkám.
  - ▶ Schopnost přežívání uvnitř makrofágů (potlačení buněčné imunity → produkce minima protilátek).
  - ▶ *M. tuberculosis* – TBC
  - ▶ *M. leprae* – lepra
  - ▶ *M. bovis* a očkovací kmen *M. bovis* BCG (Bacil Calmettův-Guerinův)
  - ▶ Atypická mykobakteria
- 



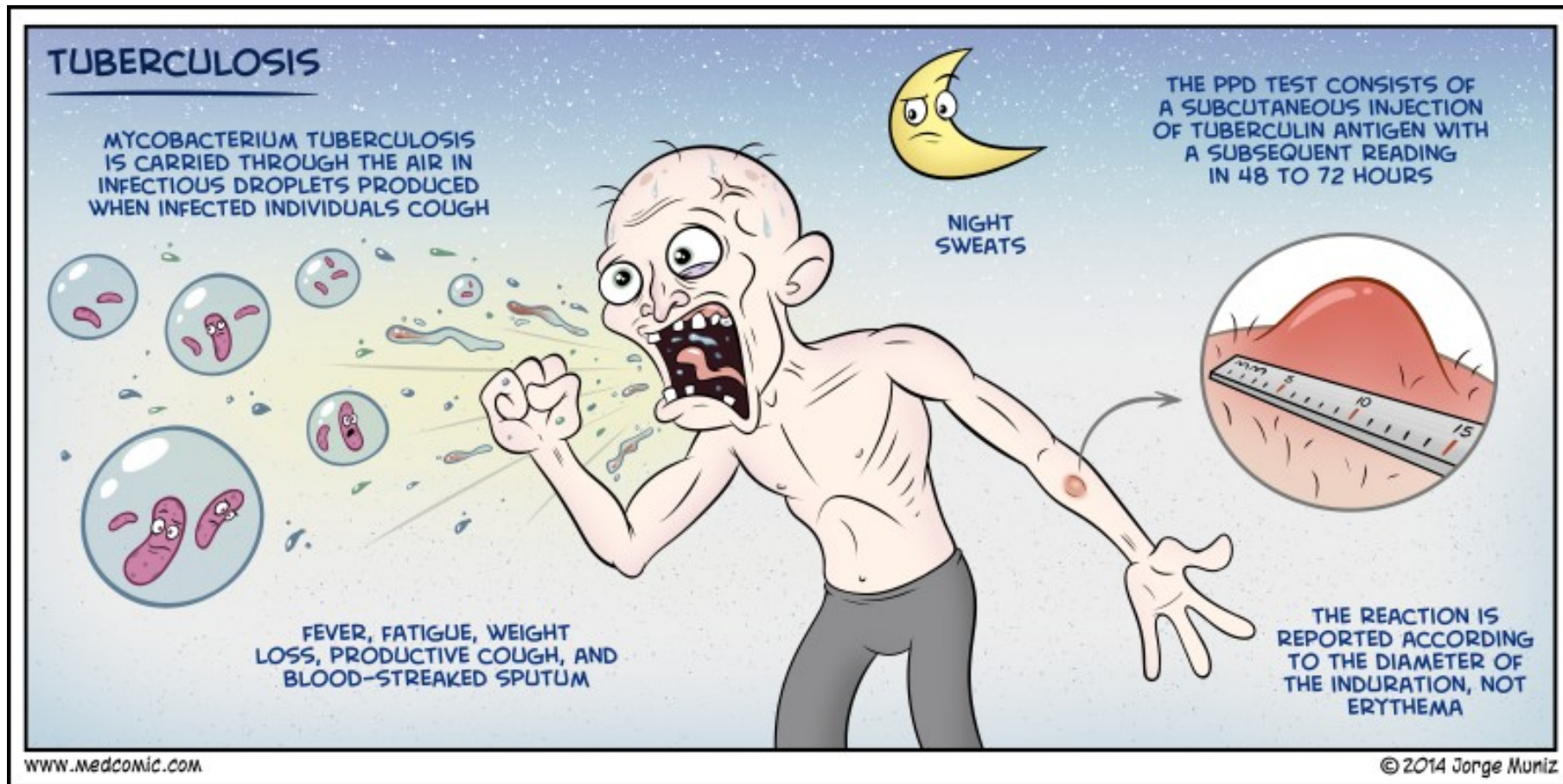
# Tuberkulóza (TBC) (1)

---

- ▶ **Původce:** *Mycobacterium tuberculosis* (Kochův bacil), vzácně *Mycobacterium bovis*
- ▶ **Vstup:** nejčastěji přes plíce, vzácně přes ránu nebo GIT
- ▶ **Vývoj nemoci:**
  - **Vznik primárního komplexu** = zánětlivé ložisko v plicním parenchymu, manifest zánětem a zvětšením příslušné mízní uzliny.
  - Zapojení buněčné imunity → **hojení ložiska kalcifikací nebo fibrotizací.**



# Tuberkulóza (TBC) (2)



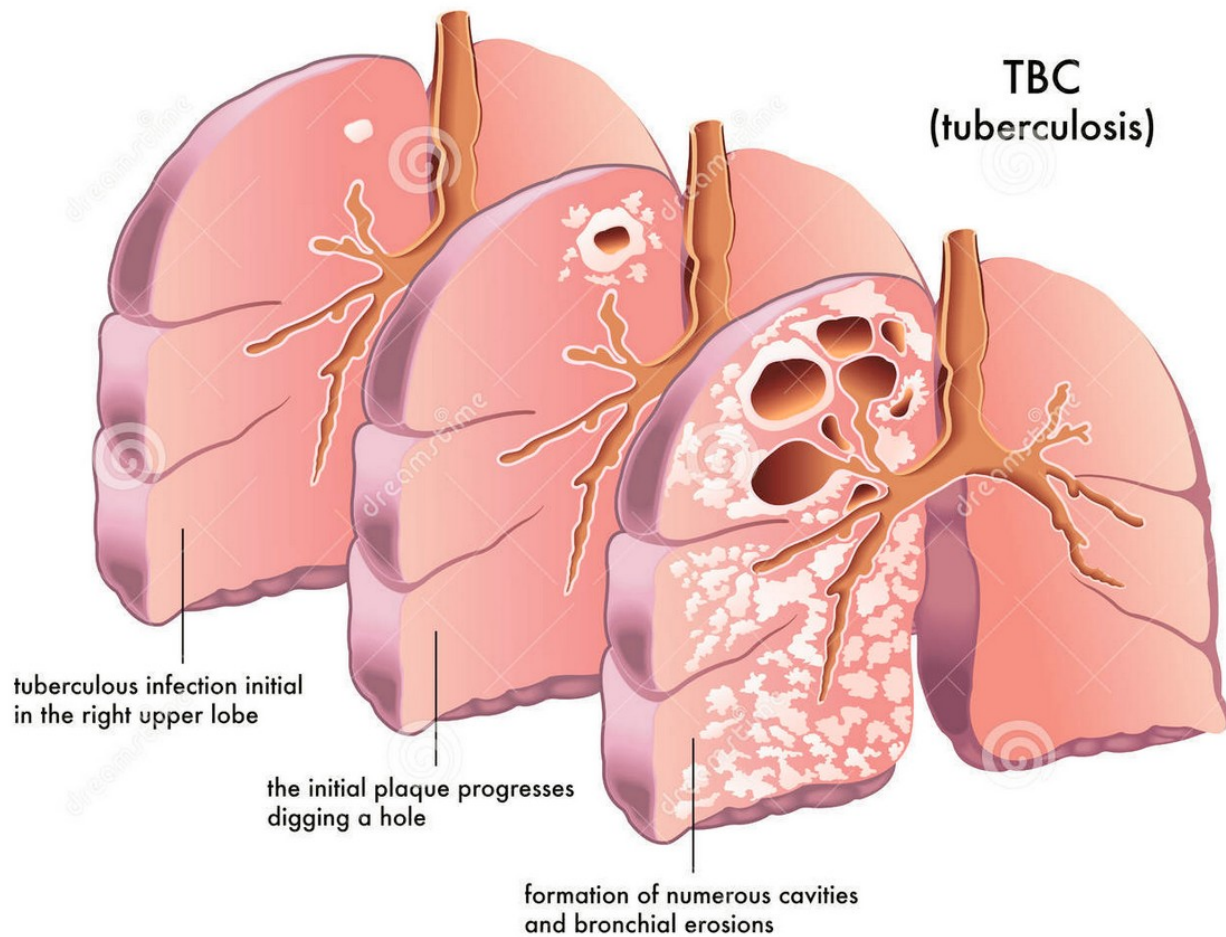
# Postprimární TBC (1)

---

- ▶ Dojde k spontánnímu celkovému zhojení, ale **ložiska infekce** (granulomy neboli tuberkuly) **kaseifikují** → rozpad jádra a jeho zkapalnění → uvolnění infekčního obsahu do bronchů → **vykašlávání = otevřená forma TBC.**
- ▶ Možnost šíření krví → **infekce kteréhokoliv orgánu = miliární TBC.**
- ▶ Vyvíjí se několik týdnů, ale klidně až mnoho let po prodělání primární infekce.
- ▶ K reaktivaci dojde po opakované infekci mykobakteriemi, u progradující primární infekce (oslabení jedinci, těžká respirační infekce aj.).
- ▶ **Příznaky otevřené TBC:** kašel, vykašlávání krve (hemoptýza), hubnutí, zvýšená teplota. Vzácně bezpříznakové.



# Postprimární TBC (2)



Download from  
**Dreamstime.com**

This watermarked comp image is for previewing purposes only.



ID 28061857

© Rob3000 | Dreamstime.com

# Léčba TBC

---

- ▶ **Antituberkulotika** – vždy v kombinaci více léčiv → častý a snadný vznik rezistencí.
- ▶ **1. řada antituberkulotik: izoniazid, rifampicin, pyrazinamid, etambutol, streptomycin**
- ▶ **2. řada:** amikacin, kanamycin, capreomycin, ofloxacin, ciprofloxacin, cykloserin, rifabutin, ...
- ▶ Vývoj vysoce rezistentních kmenů:
  - **MDR** (multidrug-resistant): izoniazid a rifampicin
  - **XDR** (extensively drug-resistant): izoniazid, rifampicin, alespoň 1 chinolon, amikacin/kanamycin/capreomycin
- ▶ **Léčba 4 až 12 měsíců:**
  - **iniciální:** čtyřkombinací po 2 měsíce (snížení množ.)
  - **pokračovací:** dvojkombinací (sterilizace ložiska)



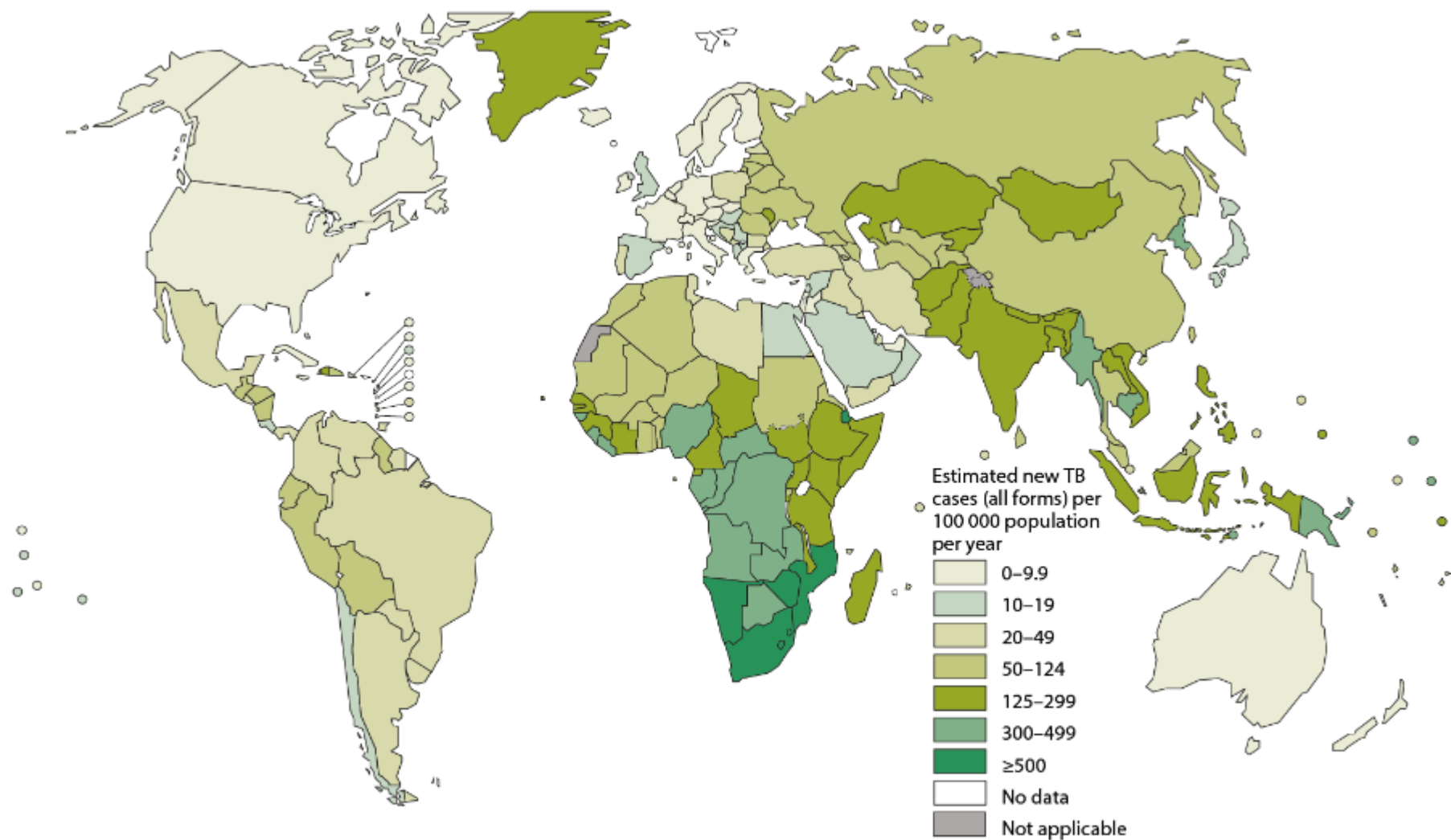
# Očkování proti TBC

---

- ▶ Do roku 2010 povinné očkování všech dětí a povinný následný tuberkulinový test.
  - ▶ **Očkování: BCG** vakcína (kalmetizovaný kmen *Mycobacterium bovis* BCG, vakcína z něj připravena pasážováním).
  - ▶ Od roku 2010 očkování pouze selektivně u ohrožených jedinců (výskyt v rodině, delší pobyt v zemích s vysokou incidencí TBC, ...).
  - ▶ Vzácně docházelo po naočkování ke generalizované infekci očkovacím kmene, avšak pouze u novorozenců s defektem imunity.
- 



## Estimated TB incidence rates, 2013



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

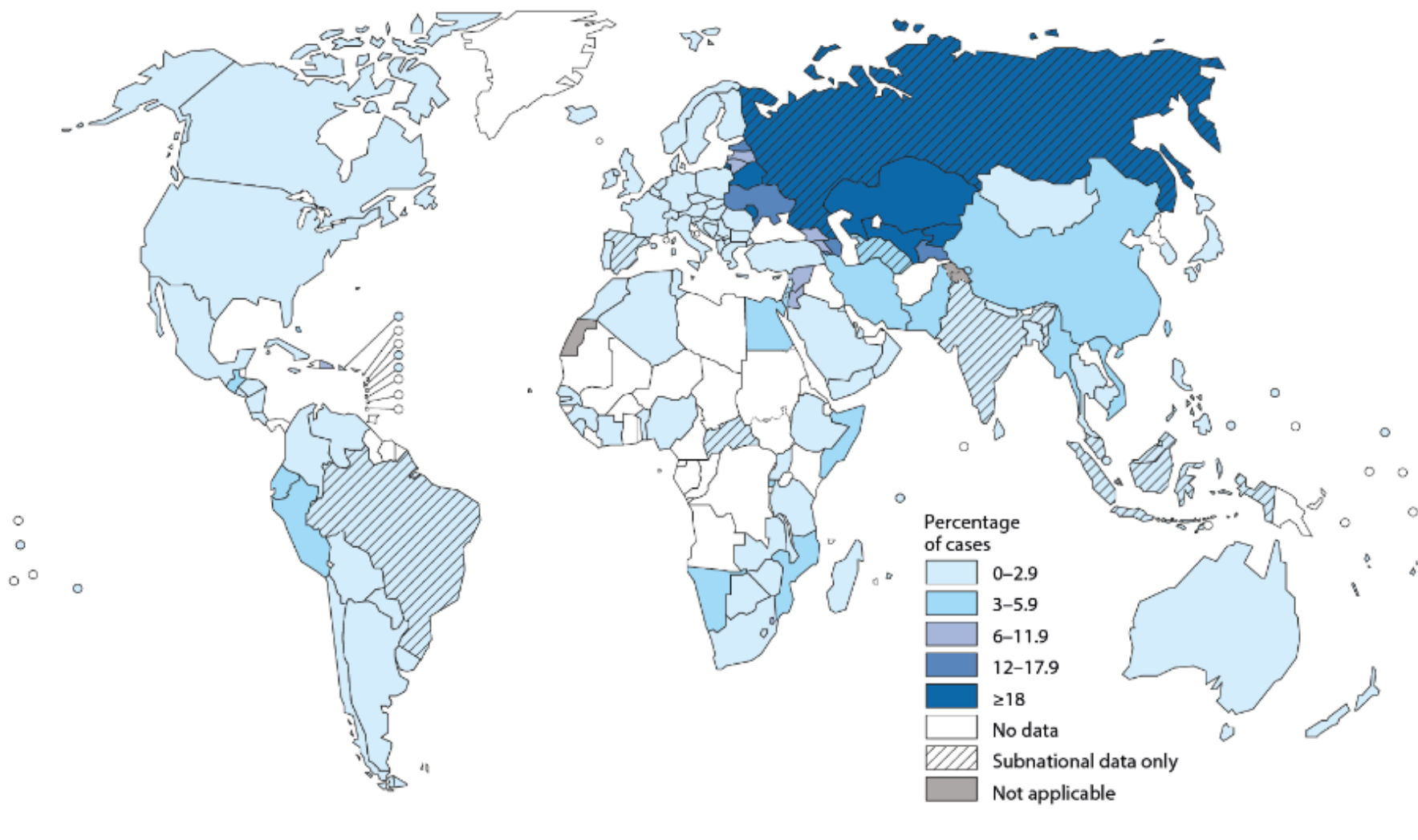
Data Source: *Global Tuberculosis Report 2014*. WHO, 2014.

© WHO 2014. All rights reserved.



World Health Organization

## Percentage of new TB cases with MDR-TB



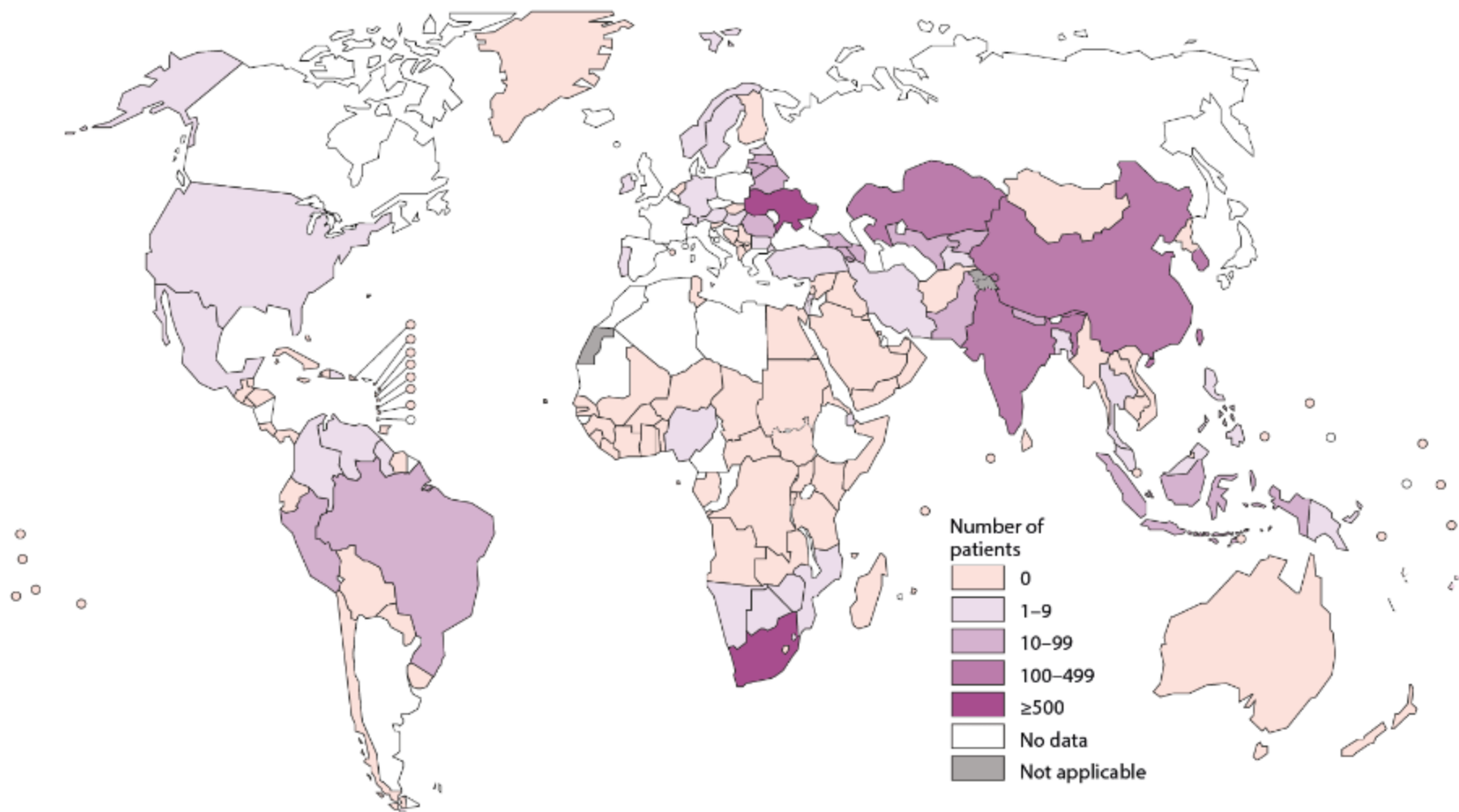
The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: *Global Tuberculosis Report 2014*. WHO, 2014.

© WHO 2014. All rights reserved.



## Number of patients with laboratory-confirmed XDR-TB started on treatment in 2013



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: *Global Tuberculosis Report 2014*. WHO, 2014.

© WHO 2014. All rights reserved.



# Lepra (malomocenství) (1)

---

- ▶ **Původce:** *Mycobacterium leprae* (Hansenův bacil)
- ▶ Extrémně dlouhá generační doba (až dva týdny), inkubační doba až několik let.
- ▶ Rostou při nižší teplotě (30 °C) → napadá především okrajové části těla.
- ▶ Často probíhá bezpříznakově, není příliš nakažlivá (až na kožní formu s vředy), avšak může se vyvinout destruktivní forma napadající Schwannovy buňky a makrofágy).
- ▶ **Očkování:** neexistuje vakcína, avšak ochranný účinek má očkování proti tuberkulóze.
- ▶ **Léčba:** dapson, rifampicin, clofazimin v kombinaci po dobu měsíců až let.

# Lepra (malomocenství) (2)

---



vředy a nekróza na tváři  
(facies leontina)



léze na končetinách





# Atypická mykobakteria

---

- ▶ Podmíněně patogenní (tzv. mykobakteriózy)
- ▶ Rezistentní na řadu antituberkulotik
- ▶ ***M. avium komplex*** (*M. avium ssp. avium*, *M. avium ssp. paratuberculosis*, *M. intracellulare*) – lymfadenitidy, plicní procesy podobné TBC
- ▶ *M. kansasii*, *M. Xenopi* – plicní infekce
- ▶ *M. marinum* – kožní léze (fish tank granuloma, swimming pool granuloma)
- ▶ *M. ulcerans* – burulský vřed
- ▶ *M. smegmatis* – nepatogenní, součást mikroflóry



# Přímý průkaz TBC

---

- ▶ **Mikroskopie:** Ziehl-Neelsenovo barvení (možná modifikace dle Kinyouna)
- ▶ **Kultivace:** speciální půdy (pevné – přídavek vaječného bílku místo agaru), nutné moření louhem kvůli usmrcení ostatních, rychleji rostoucích bakterií.
- ▶ **Automatická kultivace:** kultivace v automatech, které detekují pozitivitu dříve
- ▶ **Pokus na zvířeti:** již se nepoužívá, dříve morče
- ▶ **PCR:** velmi významná
- ▶ **Biochemie:** pouze specializované laboratoře



# Nepřímý průkaz TBC

---

- ▶ **Protilátky:** jejich tvorba je minimální (pozitivní nález je známkou infekce, negativní nález nemá hodnotu)
- ▶ **Testování buněčné imunity:**
  - **kožní (tuberkulinový) test** dle Mantouxové: testování po vakcinaci. Pozitivní nález: mírné zarudnutí a zatvrdnutí v okolí místa vpichu po 3 dnech
- ▶ **Test uvolňování INF $\gamma$**  (reakce pacientových buněk na antigen) – test QuantiFERON-TB Gold.



# QuantiFERON-TB Gold

---

- ▶ Vyšetření indukovaného uvolňování  $\text{INF}\gamma$ .
  - ▶ Při TBC (i latentní) tuberkulózní antigeny aktivují T-lymfocyty, které tvoří velké množství  $\text{INF}\gamma$
  - ▶ Odebírá se nesrážlivá (heparinizovaná) krev do tří zkumavek:
    - **1. zkumavka:** obsahuje mitogen (MIT) phytohemagglutinin – zde by mělo dojít ke stimulaci tvorby  $\text{INF}\gamma$  vždy (kromě nedostatku/snížené aktivity lymfocytů)
    - **2. zkumavka:** obsahuje antigeny TBC (TB) – ke stimulaci tvorby  $\text{INF}\gamma$  dojde při infekci TBC
    - **3. zkumavka:** pro odečet pozadí (NIL)(nespecifický  $\text{INF}\gamma$ , heterofilní protilátky)
- 



# QuantiFERON-TB Gold – hodnocení

---

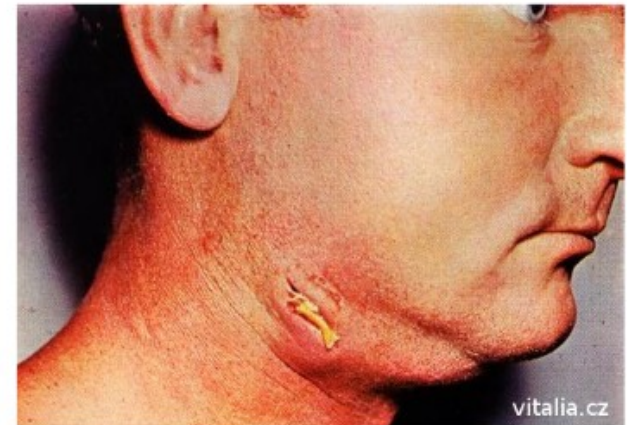
- ▶ **Pozitivní:** ve zkumavce TB T-lymfocyty reagují na stimulaci antigenem, ve zkumavce NIL (pozadí) nedochází k tvorbě interferonu
- ▶ **Negativní:** T-lymfocyty reagují na stimulaci mitogenem (MIT) ale nereagují na stimulaci antigenem mykobakterie (TB)
- ▶ **Neurčitý výsledek:** T-lymfocyty nereagují na stimulaci mitogenem (MIT) nebo ve zkumavce NIL (pozadí) dochází k tvorbě interferonu



# *Actinomyces spp.*

---

- ▶ Anaerobní vláknité grampozitivní bakterie (částečně acidorezistentní špatně se barví Gramovým barvením).
- ▶ Běžně v dutině ústní, nosohltanu, střevě, vagině → endogenní nákazy.
- ▶ Aktinomykóza (*A. israeli*, *A. naeslundii*):
  - cervikofaciální, intrathorakální, abdominální, kožní, děložní
  - abscesy (chronické podkožní abscesy) a píštěle
- ▶ Osteomyelitida (*A. israeli*)



# *Nocardia spp.*

---

- ▶ G+ aerobní tyčky až vlákna, častečně acidorezistentní.
- ▶ Půdní bakterie (subtropy, tropy) → exogenní nákazy.
- ▶ Chronické kožní abscesy
- ▶ *N. asteroides* – plicní infekce (možná diseminace, mozkové abscesy)
- ▶ *N. brasiliensis* – podkožní absce



# Úkol č. 1 – Mikroskopie, barvení dle Ziehl-Neelsena (1)

---

- ▶ **1a) Barvení dle Ziehl-Neelsena:**
  - **Barvíme karbolfuchsinem** (Gabbet) za horka až do výstupu par (po odpaření části barviva ho doplníme a opět zahříváme, opakujeme celkem 3x).
  - Zahřívání provádíme v dostatečné vzdálenosti, aby v průběhu neprasklo podložní sklíčko!
  - **Odbarvujeme cca 15 sekund** kyselým alkoholem (směs ethanolu s HCl nebo s kyselinou sírovou).
  - **Opláchneme vodou.**
  - **Dobarvujeme** pozadí malachitovou zelení nebo metylénovou modří cca **30 sekund**.
- ▶ Barvení lze použít i pro střevní kokcidie (kryptosporidia a cyklospory).





# Úkol č. 1 – Mikroskopie, barvení dle Ziehl-Neelsena (2)

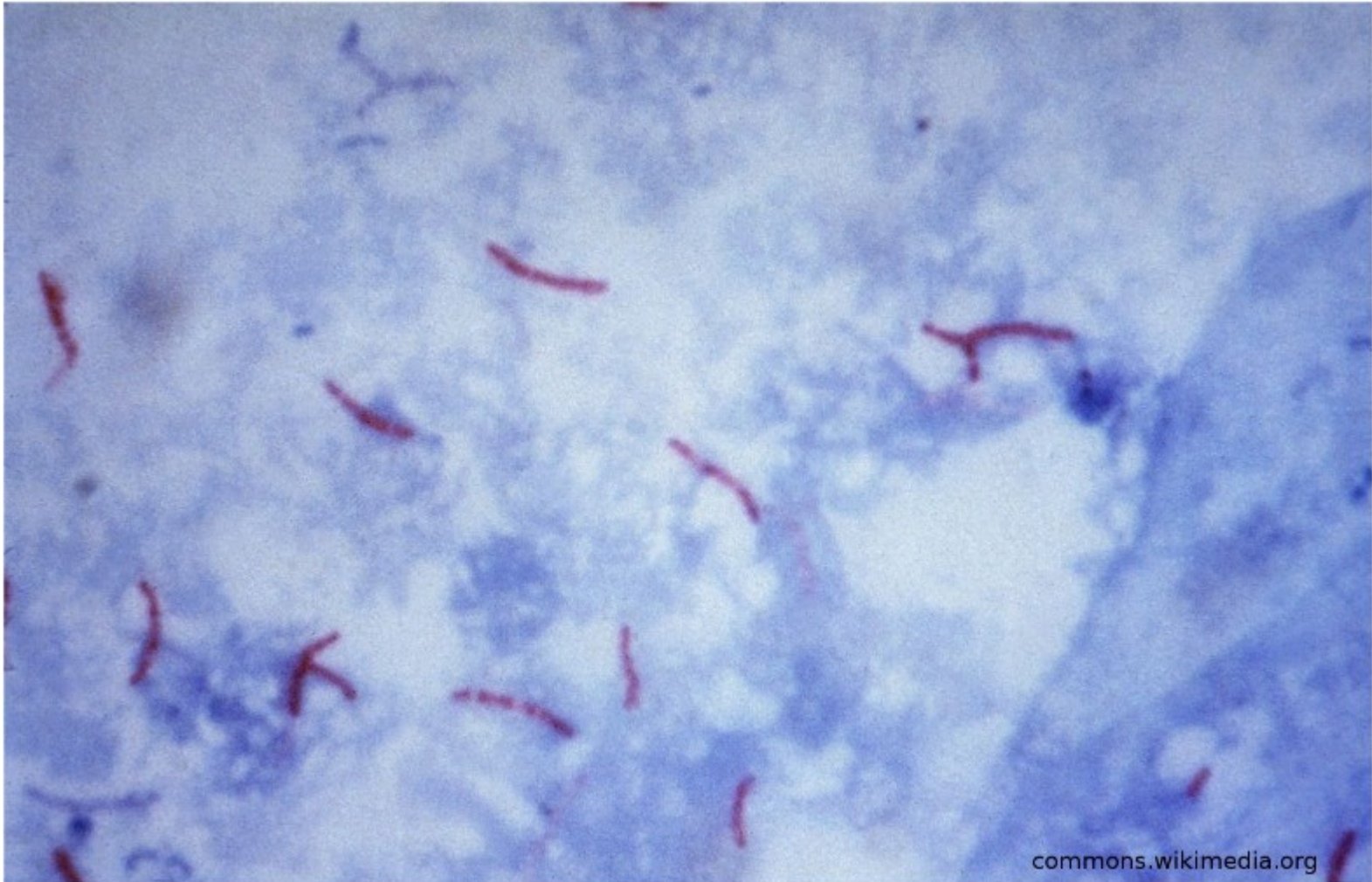
---

- ▶ **1b)** Připravený preparát mykobakterií barvený Ziehl-Neelsenem.
- ▶ **1c)** Připravený preparát aktinomycet, nokardií barvený Gramem.
- ▶ Pozorujeme v mikroskopu preparáty, vše, co vidíme, pečlivě zakreslíme!



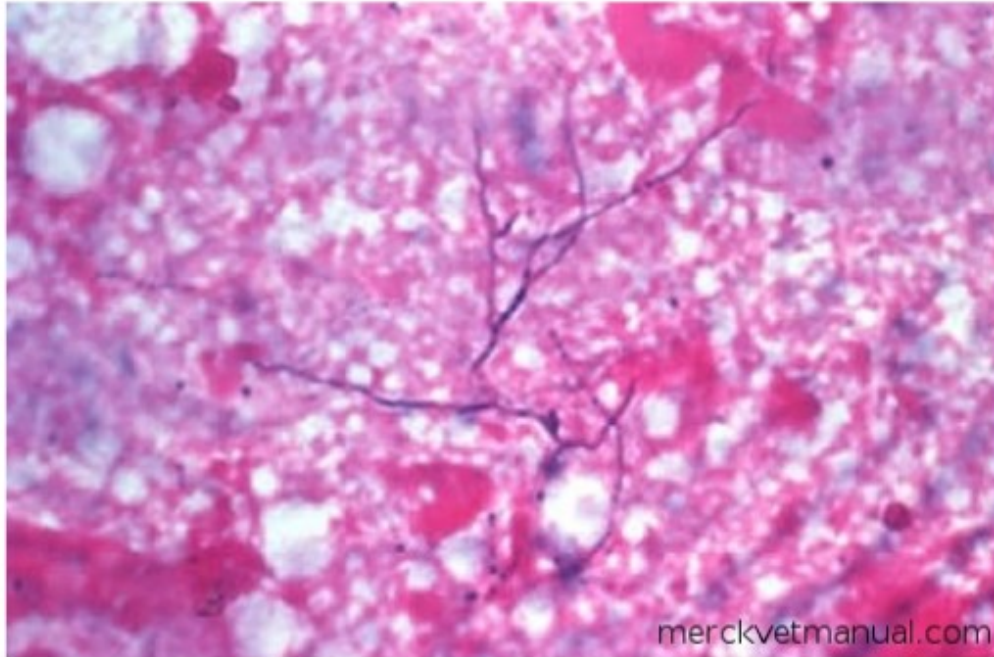
# Úkol č. 1 – Mikroskopie, barvení dle Ziehl-Neelsena (3)

---

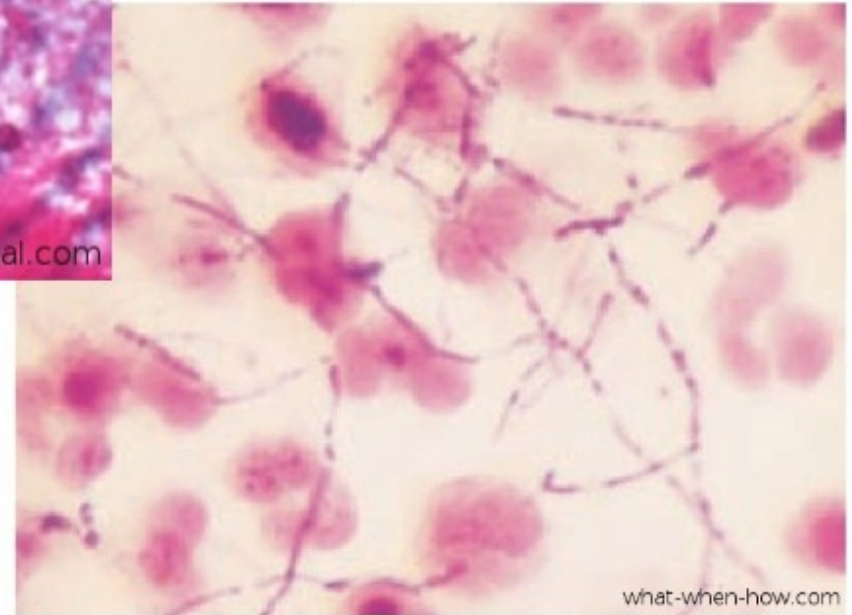


# Úkol č. 1 – Mikroskopie, barvení dle Ziehl-Neelsena (4)

---



aktinomycety



nokardie



# Úkol č. 2 – Kultivace (1)

---

- ▶ *M. tuberculosis*:
  - před kultivací moření louhem
  - **tekuté půdy: Šulova, Baničova** (nárůst na dně zkumavky – modrý/bílý)
  - **pevné půdy: Ogawova či Löwenstein-Jenssenova** (půdy neobsahují agar – tuhost dodává vaječný bílek)
- ▶ Pevné půdy se nalévají do zkumavek a uzavírají zátkou (vyschnutí půdy při dlouhé kultivaci)
- ▶ **Odečítání výsledků:** za 1 týden (kontrola kontaminace), 3 (rychle rostoucí mykobakterie), 6 (obvykle pozitivní nálezy) a 9 (pomalu rostoucí mykobakterie) týdnů kultivace.
- ▶ Nokardie – krevní agar, aerobní podmínky
- ▶ Aktinomycety – anaerobní podmínky, VL agar, bujon



## Úkol č. 2 – Kultivace (2)

---



růst na pevné půdě

---

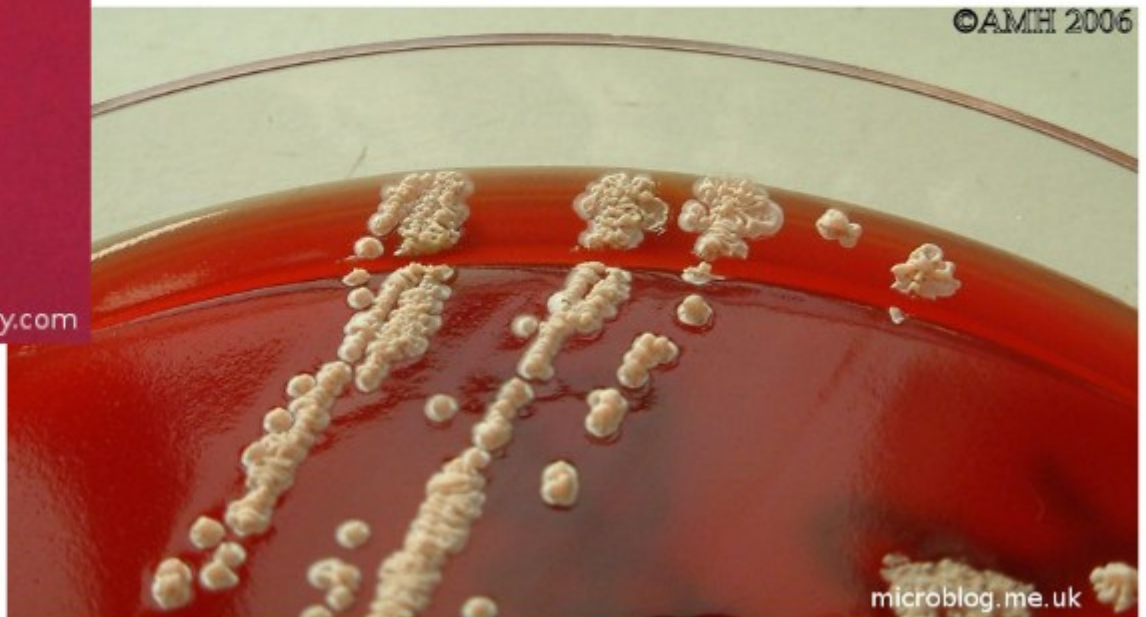


# Úkol č. 2 – Kultivace (3)

---



aktinomyceety



nokardie



# Úkol č. 3 – Určování citlivosti na antimikrobiální látky

---

- ▶ **3a:** Test na citlivost na antituberkulóza se neprovádí jako difuzní diskový, ani jako E-test. Jednotlivá antituberkulóza se přidávají přímo do média → roste: rezistentní, neroste: citlivé.
- ▶ **3b:** Klasický difuzní diskový test pro nocardie a aktinomykety.



# Úkol č. 4 – PCR

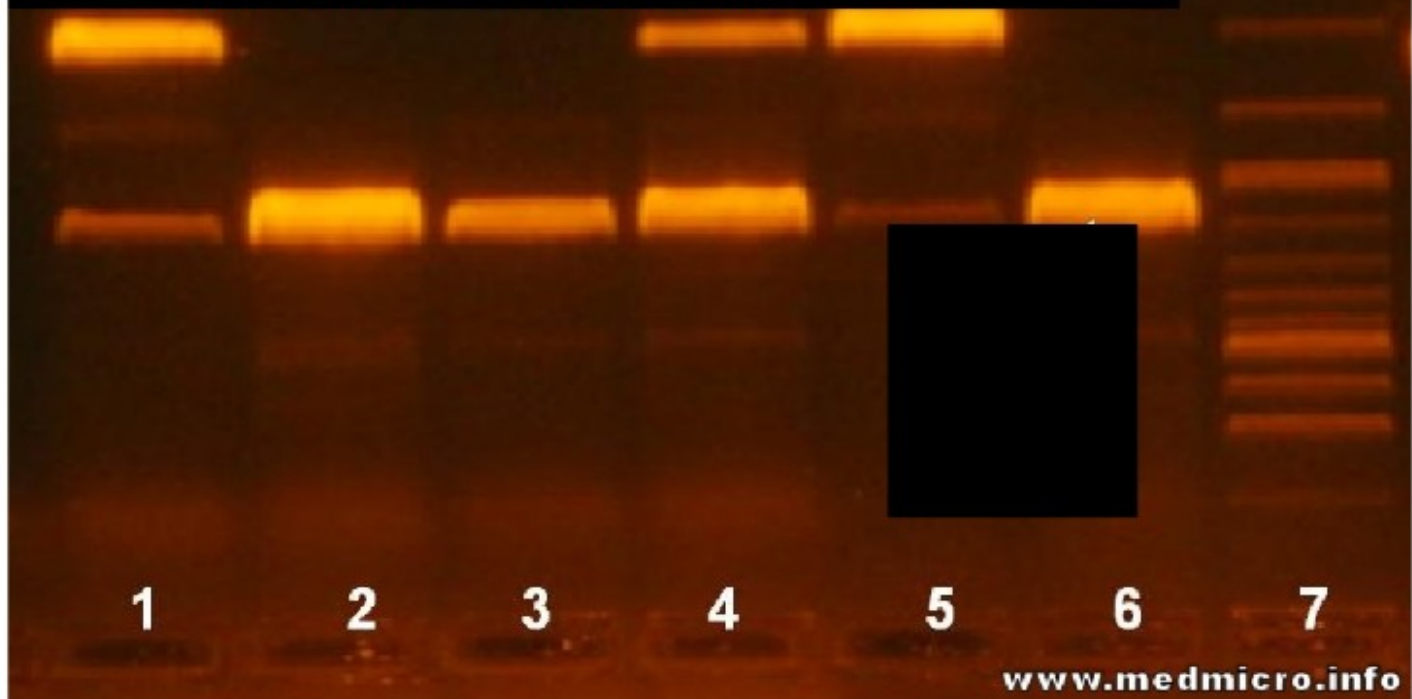
---

1, 2, 3, 4 = pacienti číslo 1, 2, . 4

5 = pozitivní kontrola 6 = negativní kontrola

7 = ladder (žebříček)

horní řádek = vlastní reakce, dolní = IC





# Úkol č. 5 – Diagnostika lepry

---

- ▶ pásovec devítipásý
- ▶ Lepromin = antigen z usmrcených bakterií *M. Leprae*, získávaný z tkání infikovaných lidí nebo pásovce
- ▶ Leprominový test = kožní test (obdoba tuberkulinového testu u TE)



# Úkol č. 6 – QuantiFERON-TB Gold – nepřímý průkaz TBC

---

<b>NIL</b>	<b>TB minus NIL</b>	<b>MIT minus NIL</b>	<b>Konečná interpretace testu</b>	<b>Přítomnost infekce <i>M. tuberculosis</i></b>
$\leq 8,0$	$< 0,35$	$\geq 0,5$	negativní	Nepravděpodobná
	$\geq 0,35$	jakákoli hodnota	pozitivní	Pravděpodobná
	$< 0,35$	$< 0,5$	nejistá	Nelze určit
$> 8,0$	jakákoli hodnota	jakákoli hodnota		



## Po tomto cvičení byste měli znát:

---

- ▶ Co je acidorezistence a jaký má dopad na diagnostiku.
- ▶ Definice rodu *Mycobacterium*.
- ▶ Průběh, diagnostika, léčba TBC.
- ▶ Základní charakteristika nokardií a aktinomycet.

