

# Mykobakteria

Alena Ševčíková,  
OKM, FN Brno

# Mykobakteria

- Bakterie specifických vlastností
  - Štíhlé acidorezistentní tyčinky
  - Speciální kultivační půdy
  - Dlouhá generační doba
  - Speciální antibiotika
- 1886 – název rodu
  - Pomalý růst
  - Vzhled kolonií

# Rod Mycobacterium – >50 druhů

- **Obligátní patogeny**

- **Komplex M. tuberculosis**

- **M. tuberculosis** (tuberkulóza)
- **M. africanum** (tbc v tropické Africe)
- **M. bovis** ((tbc krčních uzlin) skot, prasata, přenos mlékem, po roce 1968 ojedinělý výskyt
  - **M. bovis BCG** - bacil Calmettův-Guérinův - vakcinační kmen), 231 pasáží na bramborové půdě s glycerinem a žlučí během 13 let – oslabená virulence

- **M. leprae**



# Rod Mycobacterium – >50 druhů

- **Oportunní (podmíněné) patogeny**
- V zevním prostředí (slaná i sladká voda, vodovodní potrubí, studně, akvaria, hlína prach), ale i u zvířat, ryb, ptáků se vyskytují desítky různých mykobaktérií, žijících jako saprofyty
- příležitostně mohou vyvolat onemocnění u člověka – **mykobakteriózy**

# Rod Mycobacterium – >50 druhů

- **Oportunní (podmíněné) patogeny**
  - **Komplex M. avium-intracellulare**
    - M. avium
    - M. intracellulare
  - Přirozeně patogenní pro ptáky, drůbež prasata
  - U člověka – lymfadenitida krčních uzlin, plicní procesy podobné tbc
  - Rezistentní na většinu antituberkulotik

# Mykobakteriózy

- **Oportunní (podmíněné) patogeny**
  - Pomalu rostoucí
    - **M. kansasii** – endemicky v oblasti s důlním a hutním průmyslem – chron. plicní onemocnění
    - **M. marinum** – vodní rezervoáry - kožní granulómy (plovárny)
    - **M. xenopi** – vodovodní systémy
    - **M. gordonae** – kontaminanta i patogen

# Mykobakteriomy

- **Oportunní (podmíněné) patogeny**
  - Rychle rostoucí (2 – 7 dní)
    - M. fortuitum
    - M. chelonae

Kontaminanty nebo podkožní abscesy,  
osteomyelitidy

# Mykobakteria – společné vlastnosti

- **Morfologické** – vysoký obsah lipidů ve stěně, nelze je obarvit dle Grama, acidorezistence, nepohyblivé, nesporulující, aerobní tyčinky
- **Kultivační** – pomalý růst na speciálních půdách
- **Patogenní** – chronické infekce, intracelulární, kde podstatnou roli hraje reakce makroorganismu a buněčná imunita
- **Terapeutické** – citlivost na jiný typ antimikrobiálních látek, antituberkulotika



# Acidorezistence

- **Barvení dle Ziehl-Neelsena**

- Karbolfuchsin za horka
- Kyselý alkohol (s HCL)
- Dobarvení methylenovou modří nebo malachitovou zelení
- červené tyčinky

- **Fluorescenční barvení**

- auraminem O, rhodamin

- materiál

- z kultivační  
půdy



# Pomalý růst na speciálních půdách

- **Pomalu rostoucí druhy**
  - generační doba 18 – 30 hod, na půdách rostou (2) 3 – 6 týdnů (9)
- **Rychle rostoucí druhy**
  - na půdách vyrostou do 1 týdne
- **Nerostoucí in vitro**
  - *M. leprae* – generační doba 10 – 20 dní



# Patogenita

- chronické intracelulární infekce
- podstatnou roli hraje reakce makroorganismu a buněčná imunita

# Mykobakteriózy

- Granulomatózní zánětlivé onemocnění, postihující převážně plíce
- Přenos cestou inhalační, kontaktem
- Predisponující faktory: TBC, plicní fibróza, cystická fibróza, bronchiektazie, silikóza, CHOPN, HIV, geneticky podmíněná vnímavost
- Příznaky: expektorace, purulentní sputum, hemoptýza, hubnutí, febrilie, pocení, únava
- ***M. avium, M. kansasii, M. xenopi, M. fortuitum***
- rezistence na řadu antituberkulotik

# Rozdělení mykobakterií

- Rychlost růstu
  - Pomalu rostoucí (3 – 6 – 9 týdnů)
  - Rychle rostoucí (2 – 7 dnů)
- Barva kolonií
  - Nonchromogení – nerostou v pigmentovaných koloniích
  - Fotochromogení – pigmentace kolonií za přístupu světla
  - Skotochromogení – pigmentace kolonií i ve tmě

# Pomalou rostoucí (3 – 6 týdnů)

nonchromogenní, podmíněně patogenní

## ● **Komplex *M. avium-intracellulare***

- *M. avium* ssp. *avium* (pneumonie a lymfadenitidy)
- *M. intracellulare* (pneumonie a lymfadenitidy)
  - běžnými testy neodlišitelné, stejná patogenita
  - rezistence na většinu antituberkulotik
  - patogenní pro ptáky, včetně drůbeže a pro prasata
  - vyskytuje se i ve vodě
  - závažná diseminovaná onemocnění v souvislosti s AIDS
- *M. avium* ssp. *paratuberculosis* – podezření z vyvolání Crohnovy choroby

# Pomalu rostoucí (6 – 8 týdnů)

nonchromogenní

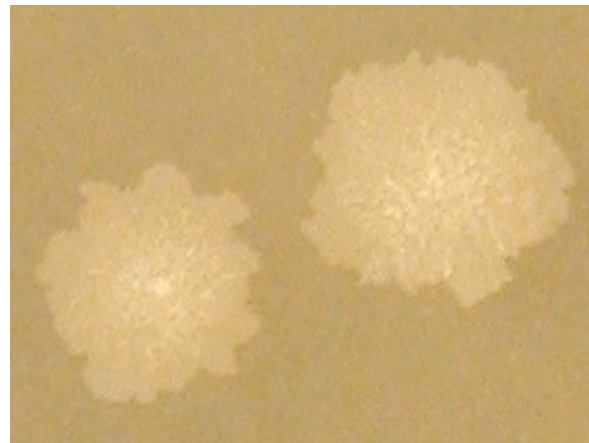
- **Mycobacterium ulcerans** – Burulský vřed
  - Třetí nejčastější mykobakterióza
  - Vlhké tropické oblasti
  - Manifestace: nodulární útvar měnící se v rozsáhlé kožní léze



# Pomalou rostoucí (3 – 6 týdnů)

fotochromogenní

- **M. kansasii** (vodovody, důlní a hutní průmysl, chronická onemocnění plic napodobující tbc)
- **M. marinum** (z bazénů, akvárií, kožní granulómy)





# Pomalu rostoucí (3 – 6 týdnů)

skotochromogenní

- **M. xenopi** z vodovodních systémů, 40-45st.C, plicní infekce, ale bývá i u zdravých osob)
- **M. gordonae** (většinou kontaminanty)



# Rychle rostoucí mykobaktéria

48 hodin do 1 týdne

- *M. fortuitum*
- *M. chelonae*
  - podkožní abscesy, osteomyelitidy po nesterilně podaných injekcích
  - kontaminanty
- *M. abscessus*
  - chronické infekce plic a ran

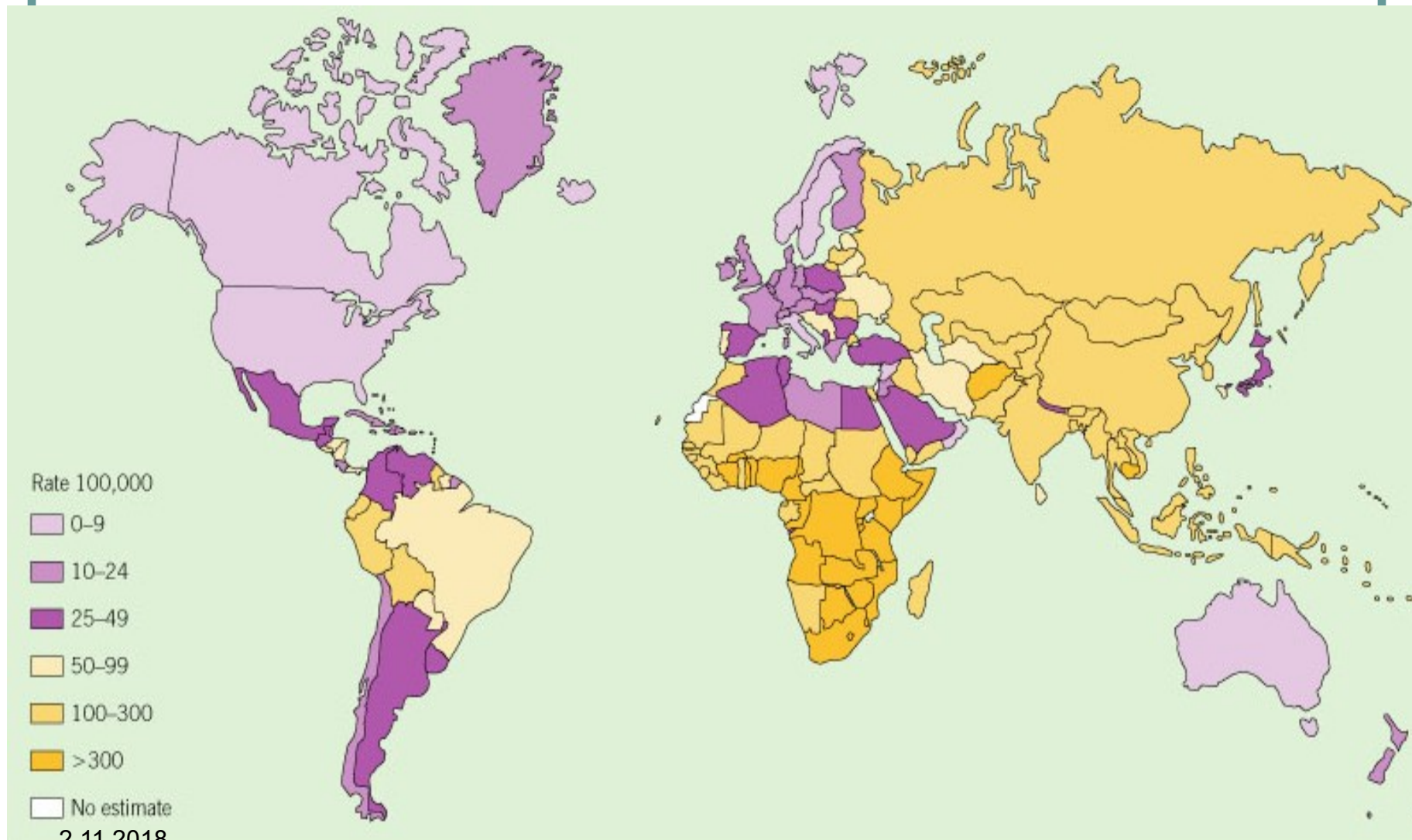


# *Mycobacterium tuberculosis*

- Pouze lidský patogen, člověk je jediný zdroj nákazy
- Dle WHO - 1/3 světové populace je infikována (2 miliardy)
- 20 miliónů má aktivní tuberkulózu
- 8 mil osob se nakazí ročně
- 3 mil osob ročně na TBC umírá

# Incidence TBC v roce 2000

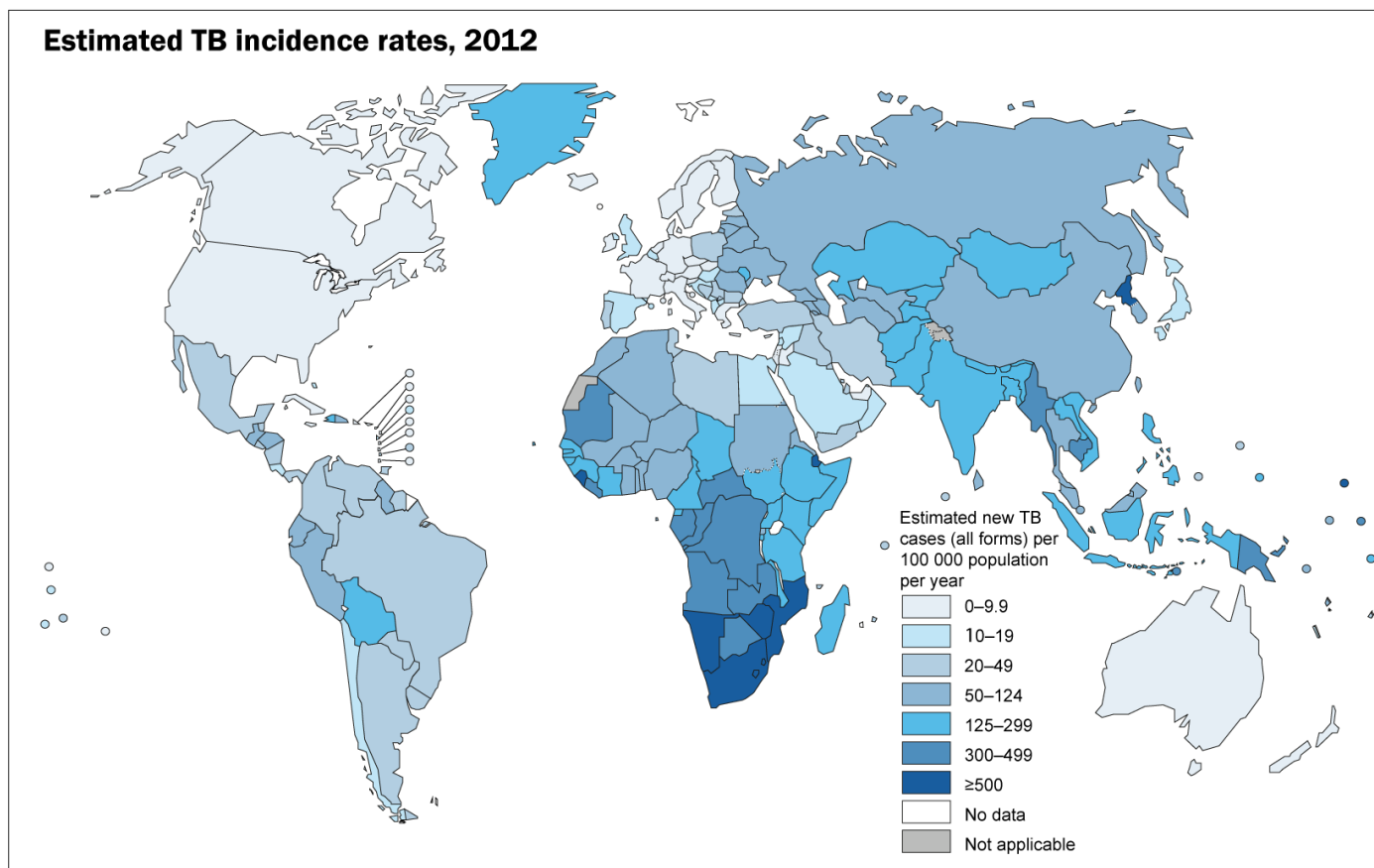
Václav Chmelík, JČU



# Incidence TBC v roce 2012

WHO

**Estimated TB incidence rates, 2012**



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 2013*. WHO, 2013.

© WHO 2013. All rights reserved.



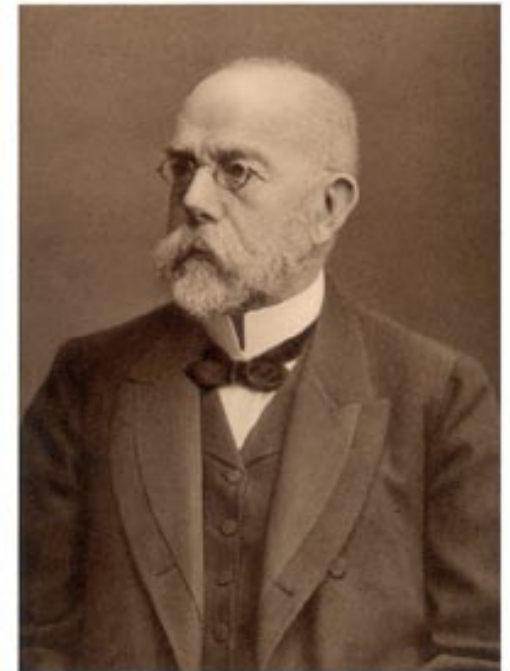
# Tuberkulóza

- Provází lidskou populaci odpradávná
  - Egyptské mumie 4000 – 2000 let př.Kr.
  - Indiáni v předkolumbovské éře
- K rozšíření a prudkému zvýšení incidence došlo během průmyslové revoluce v 17. – 19. století
  - Koncentrace obyvatel
  - Sociální podmínky

# Původce:

## *Mycobacterium tuberculosis*

- Objevil v roce 1882 Robert Koch
  - označení bacil Kochův - BK
- V roce 1905 získal Nobelovu cenu za výzkum tuberkulózy





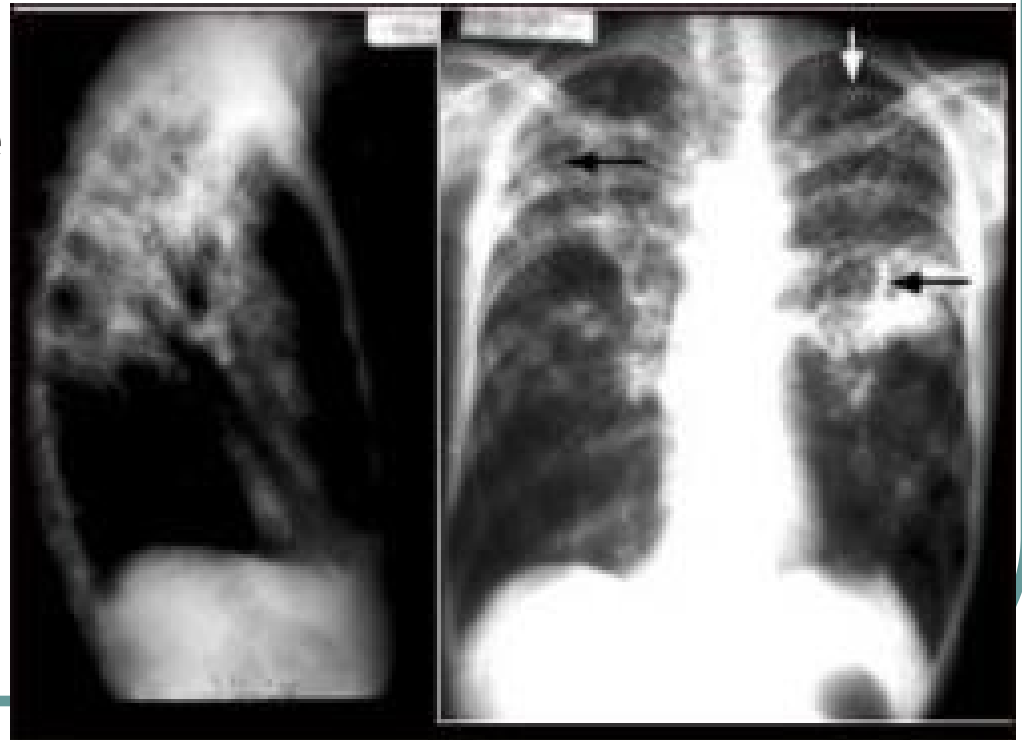
# *Mycobacterium tuberculosis*

- Faktory patogenity
  - Toxický glykolipid – CORD faktor, složka buněčné stěny
  - schopnost přežívat uvnitř makrofágů neimunního jedince
- mykobaktéria jsou přepravována makrofágy do oblastních mízních uzlin a z nich do krve a dalších orgánů
- za poškození je odpovědná reakce makroorganismu, probíhající jako typická reakce pozdní přecitlivělosti na mykobakteriální antigen



# Vstupní brána infekce

- plicní alveoly
- vzácně zažívací trakt – lymfadenitida krčních uzlin
- výjimečně kůže



# Patogeneze

- **Primoinfekce – primární komplex**
  - Úplné vyhojení
  - Klidové stádium
- **Reaktivace**
- **Reinfekce**

# Primární komplex = primární ložisko

a odpovídající lymfatická uzlina

- mykobakteria pohlčena makrofágy
- množení v makrofázích
- migrace do oblastních uzlin
- aktivace buněčné imunity
- granulóm s nekrotickým středem sýrového vzhledu - kaseifikace

# Primární komplex

- ložisko se postupně opouzdří, posléze se hojí, ohraničuje vazivem a kalcifikuje
- část mykobaktérií může zůstat naživu a proces může kdykoliv progredovat a šířit se (10%)
  - Plicní forma
  - Mimoplicní formy - meningy, klouby, kosti, ledviny, kůži
- mnohočetné drobné granulómy – miliární rozsev

# Postprimární tuberkulóza

- Ložisko se může reaktivovat i po desetiletích, nebo může dojít k exogenní reinfekcí
- Reaktivace při snížení imunity – ve stáří, při abusu drog, alkoholu, při HIV
- Vzniká rozsáhlý granulóm, který kolikvuje a může se vyprázdnit do bronchu
- V dutině se dobře množí mykobakterie (otevřená tuberkulóza), hemoptýza, teploty

# Laboratorní průkaz

- Mikroskopie
- Kultivace
- Molekulárně biologické metody
  
- Standard: sputum zasílané 3 dny za sebou
- BAL, hnis, likvor, biopsie, moč

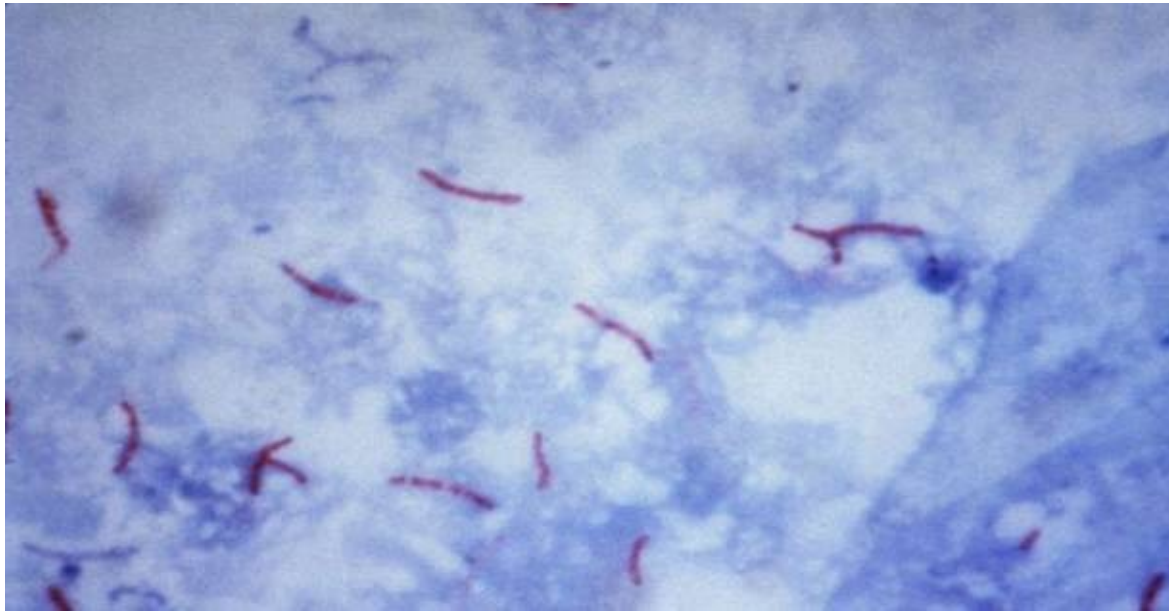
# Mikroskopie

pro vysoký obsah lipidů a vosků ve stěně mykobaktérií nelze použít Gramovo barvení

- Ziehl – Neelsen  
(100 polí při 1000 násobném zvětšení)
- Fluorescenční barvení auraminem  
(25 – 50 zorných polí při 160 – 400 násobném zvětšení)
  - Výhoda – přímý průkaz ve sputu, likvoru
  - Nevýhoda - nízká citlivost – 100x nižší než kultivace -  $10^5$  mikrobů/1mm<sup>3</sup>

# Mikroskopie

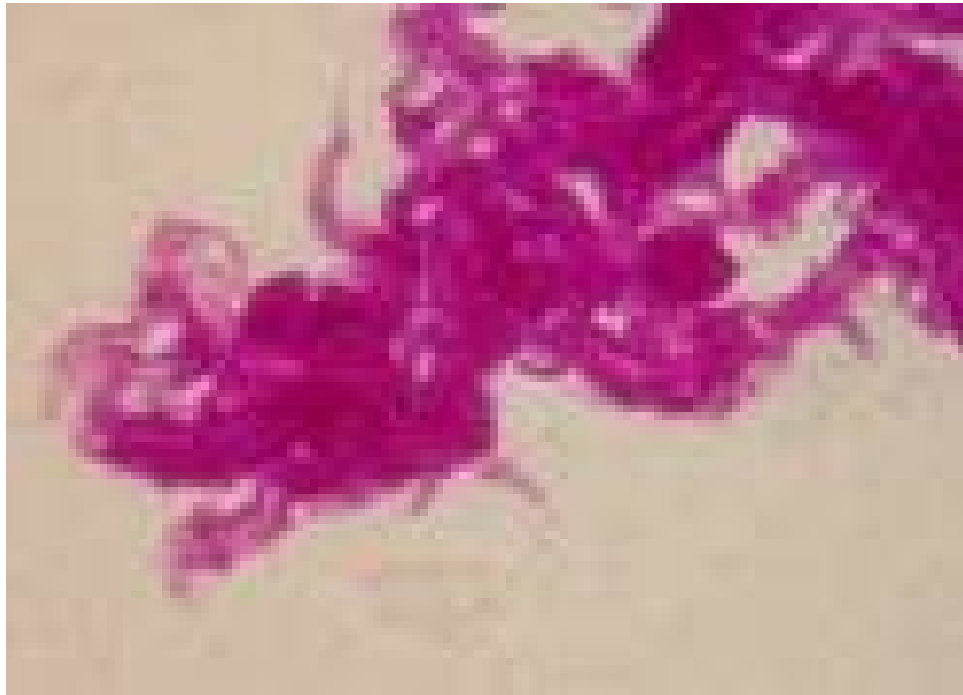
- velmi štíhlé acidorezistentní tyčinky, někdy lehce zahnuté, či granulované, vzácně větvící se formy





# Mikroskopie

- v preparátu z kultury jsou vidět hadovité útvary připomínající spletené provazce



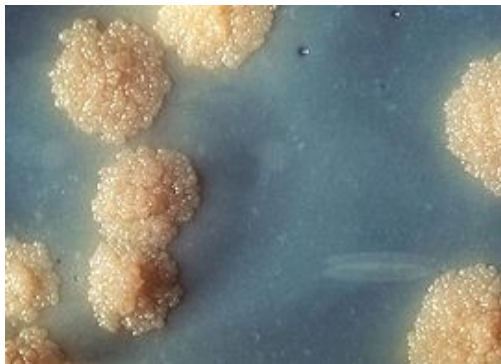
# Kultivace

- Řádově citlivější než mikroskopie
  - Odstranění doprovodné flóry dekontaminací 4% NaOH – moření – neutralizace HCl
  - Očkování na tuhé půdy (Löwenstein – Jensen, Ogawa)
    - Tekuté půdy (Šulova)
  - Hodnotí se
    - Rychlost kultivace
    - Velikost, vzhled kolonií a pigmentace kolonií
    - Produkce enzymů

# Kultivace *M. tuberculosis*

*nejprve moření louhem sodným, poté neutralizace HCl*

- Na pevných půdách vyrůstají za 3 – 6 týdnů kvěťákovité kolonie
- V tekutých půdách tvoří blanku nebo bílý krupicovitý sediment



# Kultivace *M. tuberculosis*

- Poloautomatický systém Bactec MGIT zaznamenává nárůst za 10 – 14 dní
- průkaz metabolitů, tvorby CO<sub>2</sub>



# Identifikace

- charakteristický růst
- biochemické testy
- molekulárně biologické metody - PCR
  - Identifikace přímo v materiálu
  - Identifikace z narostlé kultury
- testování citlivosti na antituberkulóza

# Pokus na zvířeti – dnes obsolentní

- Obtížně získatelný materiál: likvor, hnis, excidované uzliny,
- materiál, kde se předpokládá málo bacilů
- výrazně kontaminovaný materiál: moč, stolice
- morče, pod kůží na vnitřní straně stehna
  - po 6 týdnech pitva, mikroskopie, kultivace, histologie

# Rychlý průkaz

- molekulárně biologické metody, PCR
  - Přímou z materiálu
  - Identifikace z kultury
    - rizika: falešné positivity i negativity
    - detekce živých i mrtvých mykobaktérií

# Nebezpečí profesionální nákazy

- Infekční dávka je méně než 10 bacilů
- Jakékoliv sputum zaslané i na běžné bakteriologické vyšetření může obsahovat mykobaktéria
- Nutnost zpracovávat materiál v laminárním boxu, vyvarovat se vzniku infekčního aerosolu





# Tuberkulinový test (Mantoux)

- Proteinový komplex z filtrátu mykobakteriální kultury
- Kožní testování buněčné hypersenzitivity opožděného typu
  - Pozitivní je u infikovaných nebo vakcinovaných osob
  - Po intradermální aplikaci dochází v místě vpichu ke vzniku zánětlivého infiltrátu

# QuantiFeron (Interferon gamma release assays)

- Diagnostika latentní i aktivní infekce *M. tuberculosis*
- Detekce specifické buněčné imunitní odpovědi
- Stanovení hladiny interferonu produkovaného paměťovými T-lymfocyty pacienta in vitro po stimulaci specifickými peptidy

# QuantiFeron (Interferon gamma release assays)

- Vysoká specifita (*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*) a senzitivita i u mimoplicních forem
- Negativita u očkovaných osob
- Průkaz latentní infekce s nebezpečím přechodu do aktivní formy
  - Imunosupresivní terapie
  - Kontakty

# Terapie

- První fáze: 2 měsíce čtyřkombinace léků
- Poté 6 – 8 měsíců dvojkombinace léků
  - Každá populace obsahuje primárně rezistentní mutanty  $1:10^5$  –  $1:10^8$
- Základní antituberkulotika
  - isoniazid (INH), rifampicin (RMP), pyrazinamid (PZA), ethambutol (EMB), streptomycin (STM)
- Druhá řada
  - Fluorochinolony (FQ), makrolidy, amikacin, rifabutin, capreomycin, clofazimin)

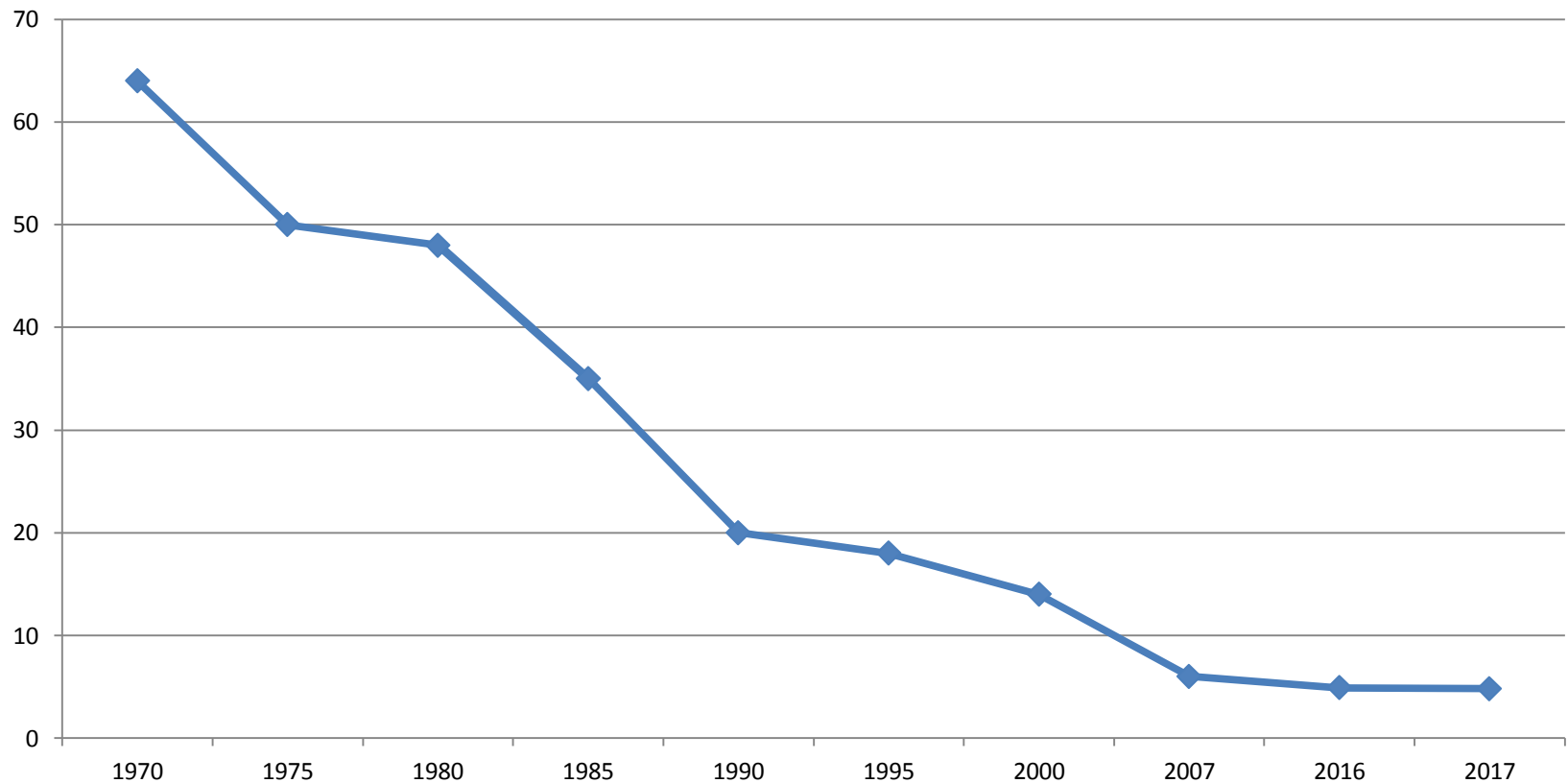
# Epidemiologie

- zdrojem je člověk s otevřenou tuberkulózou
- přenos vdechnutím infekčního aerosolu
- Incidence v ČR v roce 2000 byla 14,0 /100 000 obyvatel
- Incidence je 10krát vyšší u bezdomovců, drogově závislých, osob nápravném zařízení, u žadatelů o azyl

# Nemocnost v ČR

## TBC

Nemocnost na 100 000 obyvatel

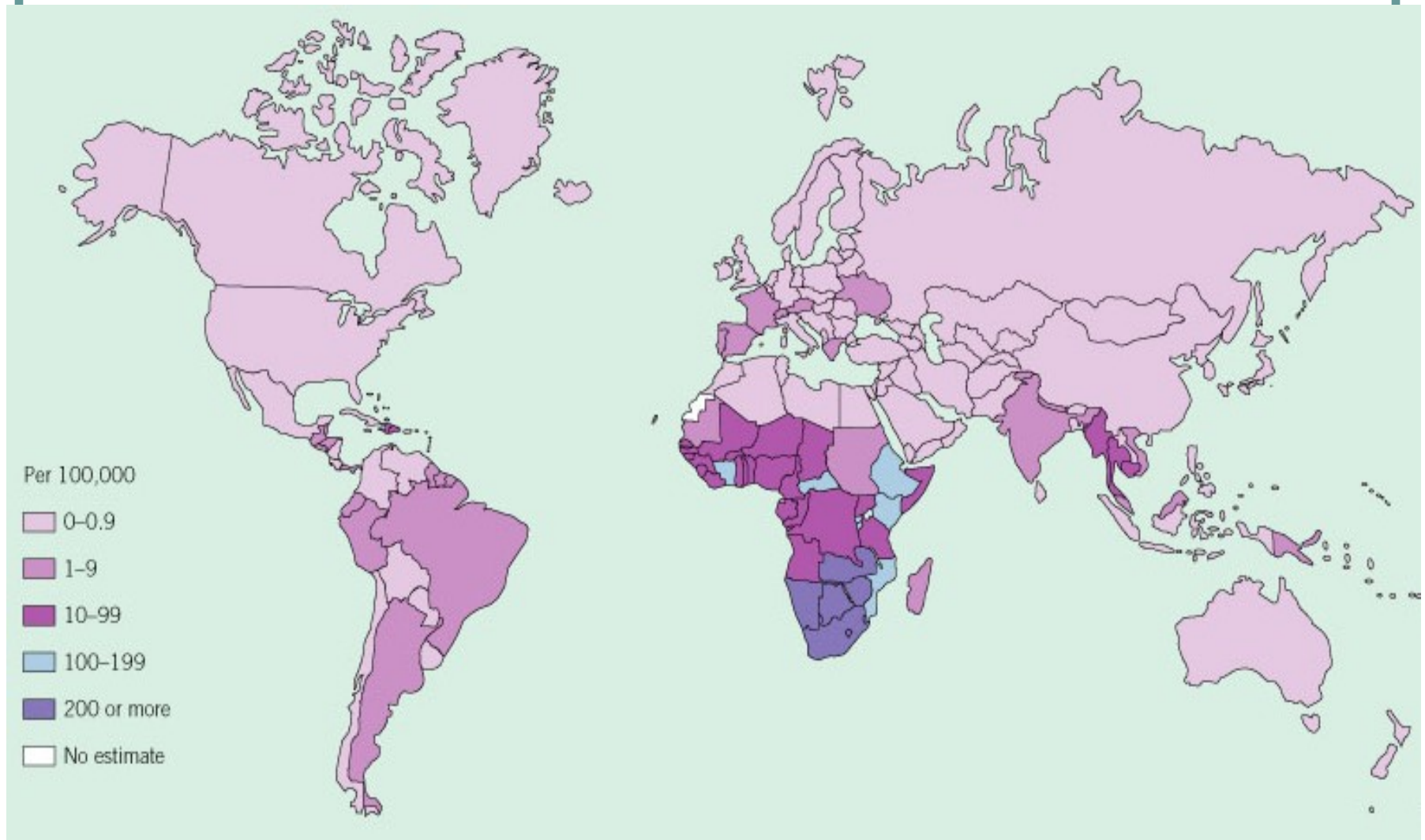


# Epidemiologie

- Z celkového počtu nemocných s tuberkulózou v roce 2007 bylo 18% cizinců
- Slovensko, Ukrajina, Vietnam, Mongolsko
- Multirezistentní TBC – její výskyt je v posledních 10 letech stabilizovaný, jedná se o cca 2,5% nemocných ročně

# Koinfekce HIV a TBC, 2000

Václav Chmelík, JČU

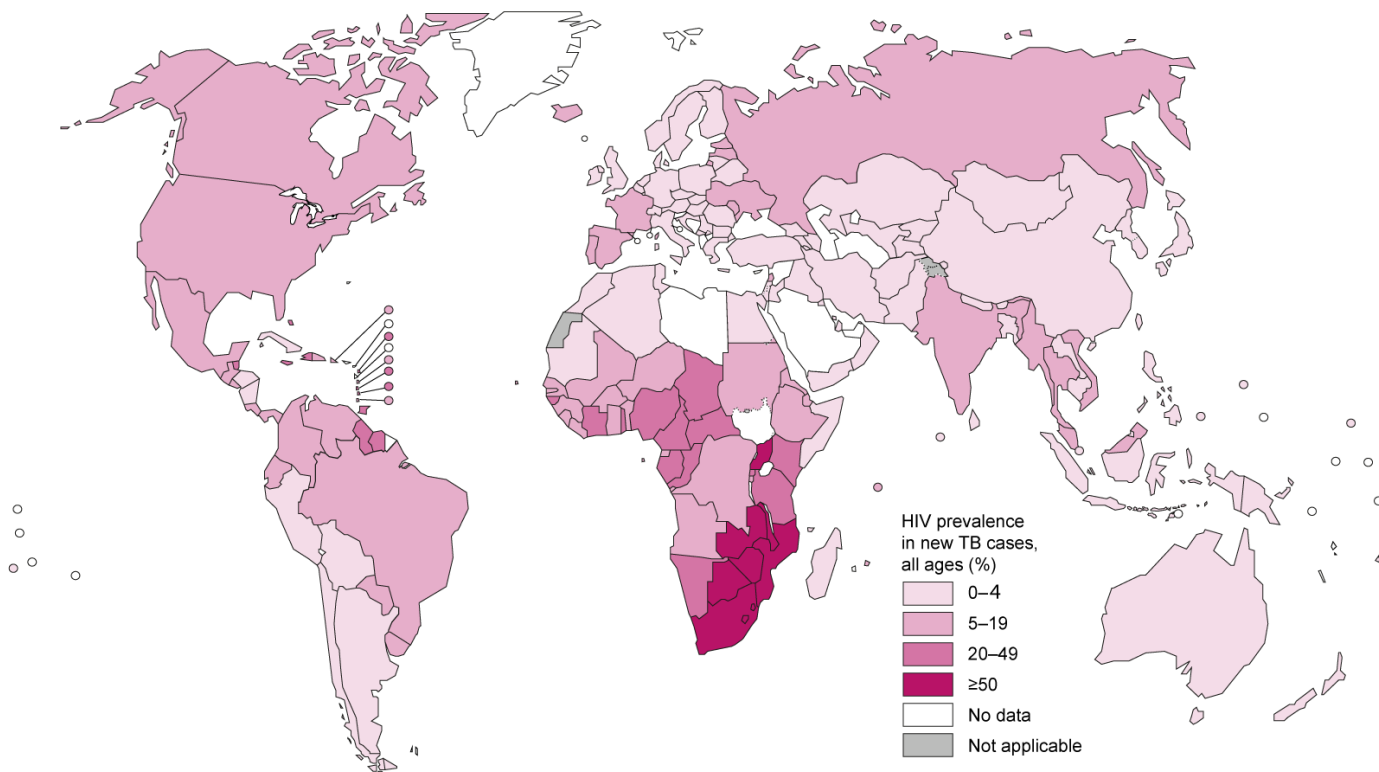


2.11.2018



# Odhad prevalence HIV u nových případů TBC, 2012

**Estimated HIV prevalence in new TB cases, 2012**



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.

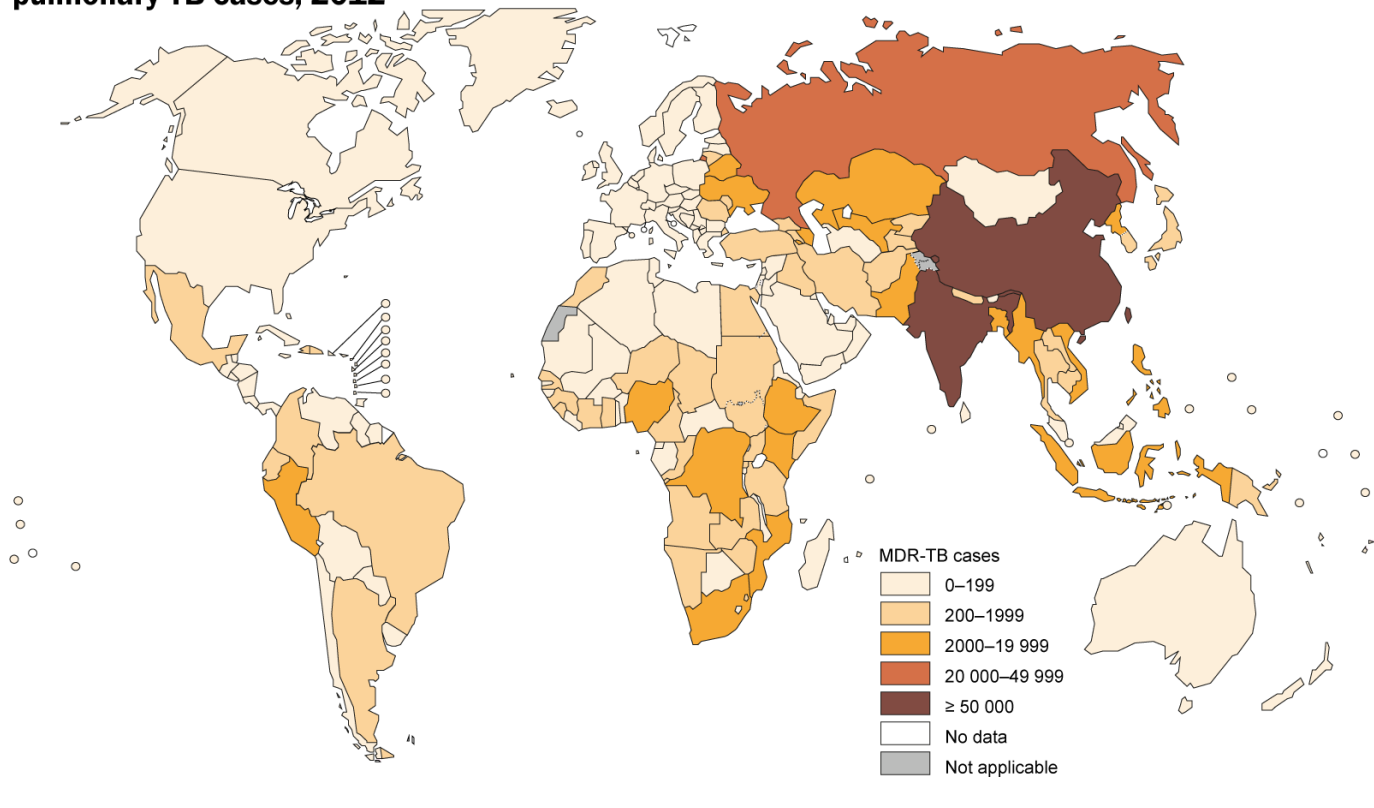
Data Source: *Global Tuberculosis Report 2013*. WHO, 2013.

© WHO 2013. All rights reserved.



# Multirezistentní mykobakteria, 2012

**Number of multidrug-resistant tuberculosis cases estimated to occur among notified pulmonary TB cases, 2012**



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 2013*. WHO, 2013.

© WHO 2013. All rights reserved.



# Nemocnost v ČR 2011

## TBC

- Incidence v roce 2011 – 5,8/100 000
- Celkový počet případů – 609
- Věková skupina 0 – 14 let - 6 případů
- Plicní formy – 87%
- Průměrný věk 58 let (cizinci 35)
- Cizinci – 18,7%
- MDR – 1,9%
- HIV – 2,6%

# Nemocnost v ČR 2013

## TBC

- Incidence v roce 2013 – 4,8/100 000
- Celkový počet případů – 502
- Nejvíce onemocnění u žen nad 75 let
- Nejvíce onemocnění u mužů nad 45 let
- Ve věkové skupině 0 – 4 roky : 3 případy
- Poměr muži : ženy – 2,1:1
- Cizinci – 15,7%

# Nemocnost v ČR 2017

## TBC

- Incidence v roce 2017 – 4,77/100 000
- Celkový počet případů – 505
- Nejčastěji ve věku 40 – 59 let, a nad 80
- Ve věkové skupině 0 – 4 roky : 5 případů
- Poměr muži : ženy – 70% : 30%
- Cizinci – 31,5% (159 případů)
- MDR – 8 případů – 2,3%

# Prevence

- Aktivní vyhledávání a léčba otevřené tuberkulózy v ohrožených skupinách obyvatelstva
- Plošná vakcinace do roku 2010
  - Novorozenci - BCG vakcína
    - Účinnost 40 – 80%
    - Chrání hlavně před miliární TBC
    - Vytváří se arteficiální primární komplex s vyhojením do 6 – 8 týdnů

# Prevence

- Cílená vakcinace
  - Děti rodičů, kteří pobývali v zemích s vysokým výskytem TBC nebo byli v dlouhodobém kontaktu s nemocným
  - Děti z rodin, kde se vyskytuje onemocnění

# *Mycobacterium leprae*

24 letý muž, trpící  
malomocenstvím





# *Lepra - malomocenství*

- Známo od starověku
  - Nejstarší zmínka – 1 500 př.n.l.
- Původce objevil norský lékař Hansen v roce 1873
  - Hansenův bacil
- Dosud se jej nepodařilo vypěstovat in vitro
- Nakazí se asi jen 1% kontaktů

# Epidemiologie

- 400 000 nových onemocnění/rok 2004
- 200 000 nových onemocnění/rok 2011
- Největší počet
  - Střední Afrika
  - Indie, Nepál
  - Brazílie
  - Španělsko, Portugalsko



# Norsko - 19. století – obrovský zdravotnický problém

- obyvatelé statků na jižních svazích fjordů se skalnatým podložím se infikovali vodou z pramenů a povrchových rybníčků
- 1850 – 1900 mezinárodní lepromatózní centrum v Evropě
- Bergenu byly tři nemocnice – největší koncentrace pacientů s leprou
- 1873 – objeven původce – Hansenův bacil
- poslední pacient zemřel 1946
- Poslední nakažený v roce 1950

# Bergen, Norsko



Bergen2011

@AISanin

2.11.2018



# Museum lepry, Bergen, Norsko



2.11.2018

# Museum lepry, Bergen, Norsko

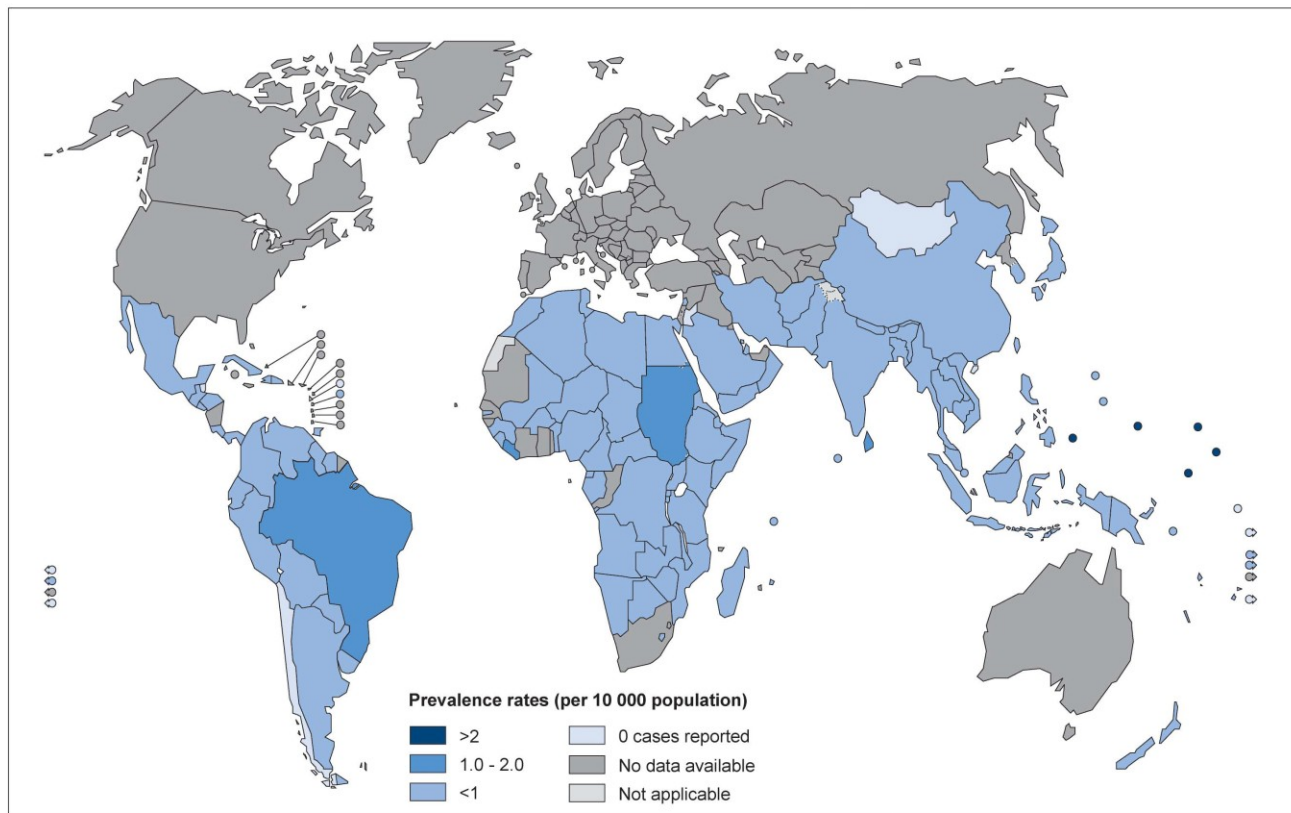


# Rumunsko

- V roce 1991 objeveno utajené leprosarium ve východním Rumunsku
- Město Tichilești ležící v deltě Dunaje je poslední dosud fungující kolonií pro malomocné v Evropě. Dnes se tu léčí 19 pacientů

# Prevalence leprosy, 2011

Leprosy prevalence rates, data reported to WHO as of beginning January 2011



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 lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2011. All rights reserved

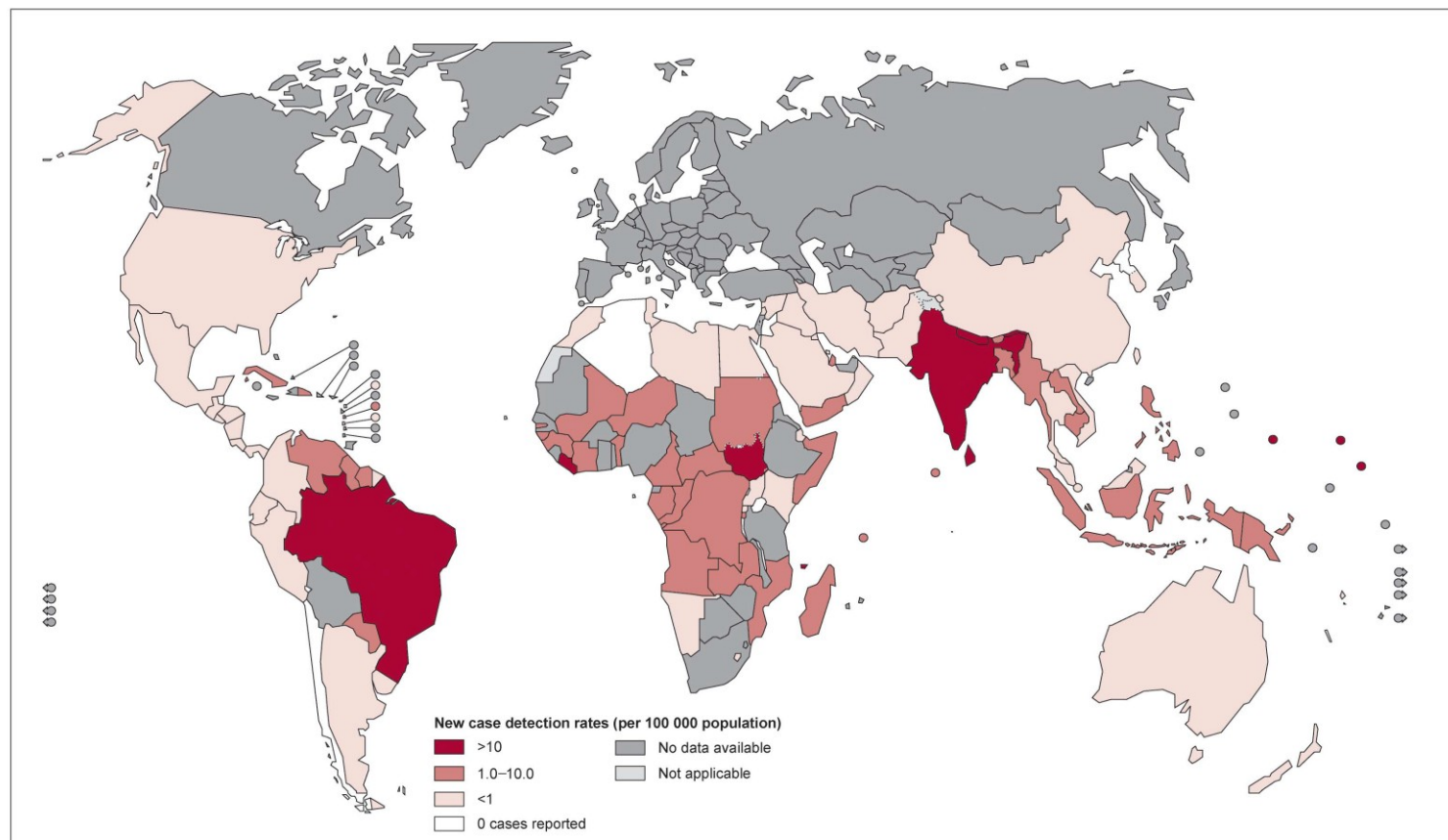
Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected  
Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization





# Nové případy lepry, 2012

Leprosy new case detection rates, data reported to WHO as of January 2012



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 lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2012. All rights reserved

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected  
Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization



# *Mycobacterium leprae*

- V pokuse se množí v amerických pásovcích



- v tzv. nahých myškách s defektní imunitou a do jisté míry na tlapce a na ouškách myši normálních
- generační doba je extrémně dlouhá 10 – 20 dnů
- optimální teplota 30°C

# *Mycobacterium leprae*

- Má výraznou afinitu ke kůži, nervům a svalům
- Je netoxické, v 1g tkáně mohou být miliardy bakterií, nejčastěji intracelulárně
- Předpokládá se přítomnost ve volné přírodě

# *Mycobacterium leprae*

- Lidská onemocnění probíhají nejčastěji
  - subklinicky
  - klinické projevy jen u malého procenta
- Dlouhodobý a přímý kontakt s infekční formou onemocnění, během kterého dochází ke snížení buněčné imunity
- Brána vstupu – respirační trakt nebo kůže
  - **Tuberkuloidní forma** (Inkub.doba: 2 – 3 roky)
  - **Lepromatózní forma** (Inkub.doba: 7 let)

# Tuberkuloidní forma



- Inkubační doba 2 – 3 roky
- Drobné depigmentace kůže , ohraničená skvrna, makula, tuberkuloid
- Nervy jsou zničeny zánětlivou reakcí
- Sklon ke spontánnímu vyhojení
- V ložisku málo bakterií, nakažlivost minimální



- **Není-li buněčná imunita dostatečná, infekce se generalizuje**
- **mykobaktéria se množí v chladnějším tkáních: v kůži, v podkoží na obličeji, v nosních chrupavkách, v kostech prstů**
- **V jakém stupni se buněčná imunita rozvine, je podmíněno geneticky**

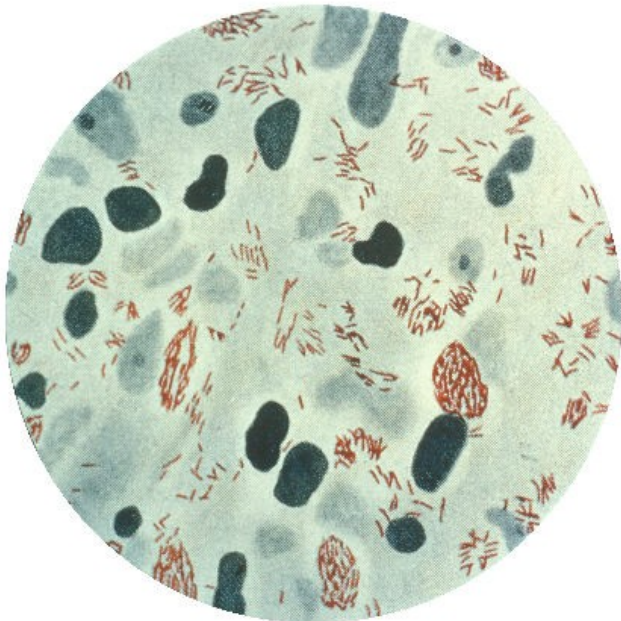
# Lepromatózní forma

- Inkubační doba minimálně 7 let
- Mnohočetná ložiska splývají, mění se ve vředy s velkým obsahem mykobaktérií, vznikají deformace
- Vředy jsou i na nosní sliznici, v DÚ postiženy jsou i vnitřní orgány
- Jedná se o maligní formu vysoce nakažlivou



# Laboratorní průkaz

- Mikroskopie



- Leprominový kožní test (Mitsudova reakce)

- Je měřítkem stavu imunity u lepromatózní formy



# Terapie

- Tuberkuloidní forma
  - Dapson a Rifampicin podobu 6 měsíců
- Lepromatózní forma
  - Trojkombinace léků 2 roky i více
    - Dapson, Clofazamid nebo Ethionamid, Rifampicin

# Prevence

- Aktivní imunizace se rutinně neprovádí
- Zjištěno, že BCG vakcína chrání 20% očkovaných proti nákaze malomocností
- Zkouší se kombinovaná vakcína
- Hodnocení nejdříve po 10 letech

Děkuji za pozornost

2.11.2018

