

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl osmý:

Acidorezistentní pachatelé

Opět začneme testíkem...

- Jaké je složení G+ buněčné stěny?

Peptidoglykan (murein), řetězce kys. teichoové

- Jaké je složení G- buněčné stěny?

Tenká vrstva mureinu, nad ní vnější membrána

- Které bakterie se nebarví podle Grama?

Ty, které nemají buněčnou stěnu, nebo ji mají hodně jinou než ostatní

- Jaké bakterie jsme viděli ve vzorcích sputa?

G+ koky ve shlucích a řetízcích, G- tyčinky

Testík pokračuje... a končí

- Jaké znáte způsoby získání anaerobiózy?

Mechanický ve VL bujónech, fyzikální u anaerobních boxů, chemický u anaerostatů

- Které anaerobní mikroby se snadno přenášejí z člověka či prostředí na člověka?

Klostridia, protože tvoří spory

- U kterých anaerobů se užívá pokusná myš?

U *Clostridium tetani* a *Clostridium botulinum*

- Který toxin se prokazuje na žloutk. agaru?

Lecitináza *Clostridium perfringens*

Úvod: Plivátka v boji proti TBC

V době první republiky vyvinula společnost za osobní angažovanosti **prezidenta Masaryka** a jeho „**Ligy proti tuberkulóze**“ velké úsilí v boji proti této nemoci. Významnou součástí byla osvěta, aby lidé neplivali na zem, ale používali plivátka.

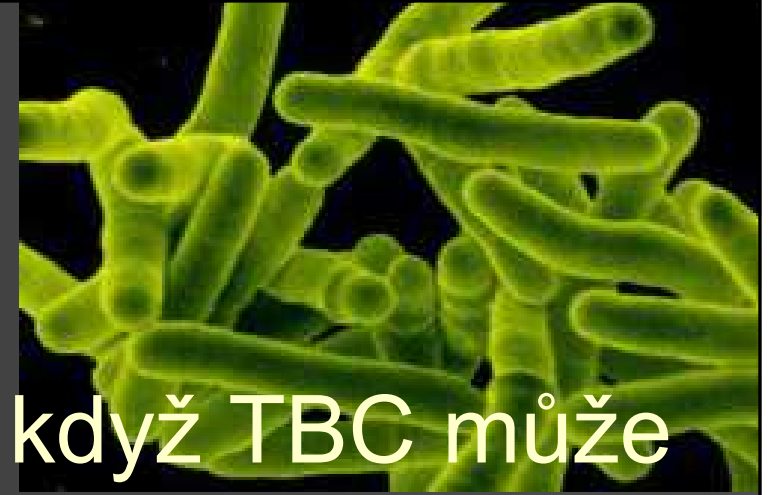


- Honza již několik let věděl, že je HIV pozitivní. Dobře věděl, že je mnohem zranitelnější než ostatní lidé, že ho každá infekce dostihne rychleji než jiné
- Přesto ho zaskočilo, že v poslední době začal kašlat. Jeho ošetřující lékaři zkoušeli různé možnosti, až nakonec na základě rentgenu, PCR vyšetření a kultivačního vyšetření dospěli k názoru, že se jedná o miliární (zrnkovitou) formu tuberkulózy.

Příběh první

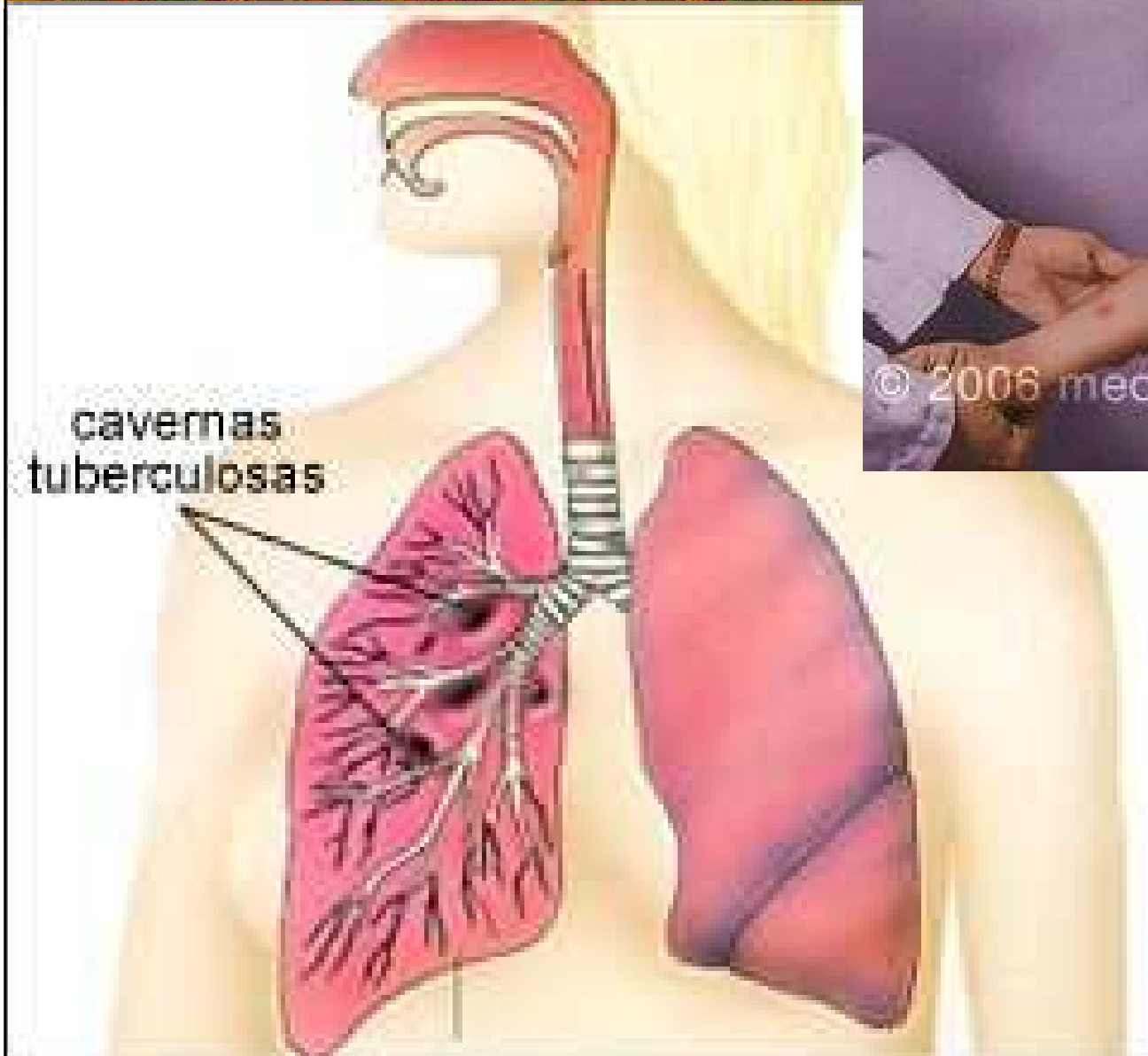


Viníkem zde bylo



- *Mycobacterium tuberculosis*, i když TBC může způsobovat i například *Mycobacterium bovis*.
- Zajímavostí tohoto mikroba je záliba v životě **uvnitř buněk**. S tím také souvisí skutečnost, že na mykobakteria se **špatně tvoří protilátková odpověď** (takže se nedá prokázat antigen ani protilátky) a že hlavní slovo má **buněčná imunita** – i při vakcinaci.
- Jelikož při HIV infekci je právě **buněčná imunita** postižena, je TBC jednou z **oportunních infekcí**.

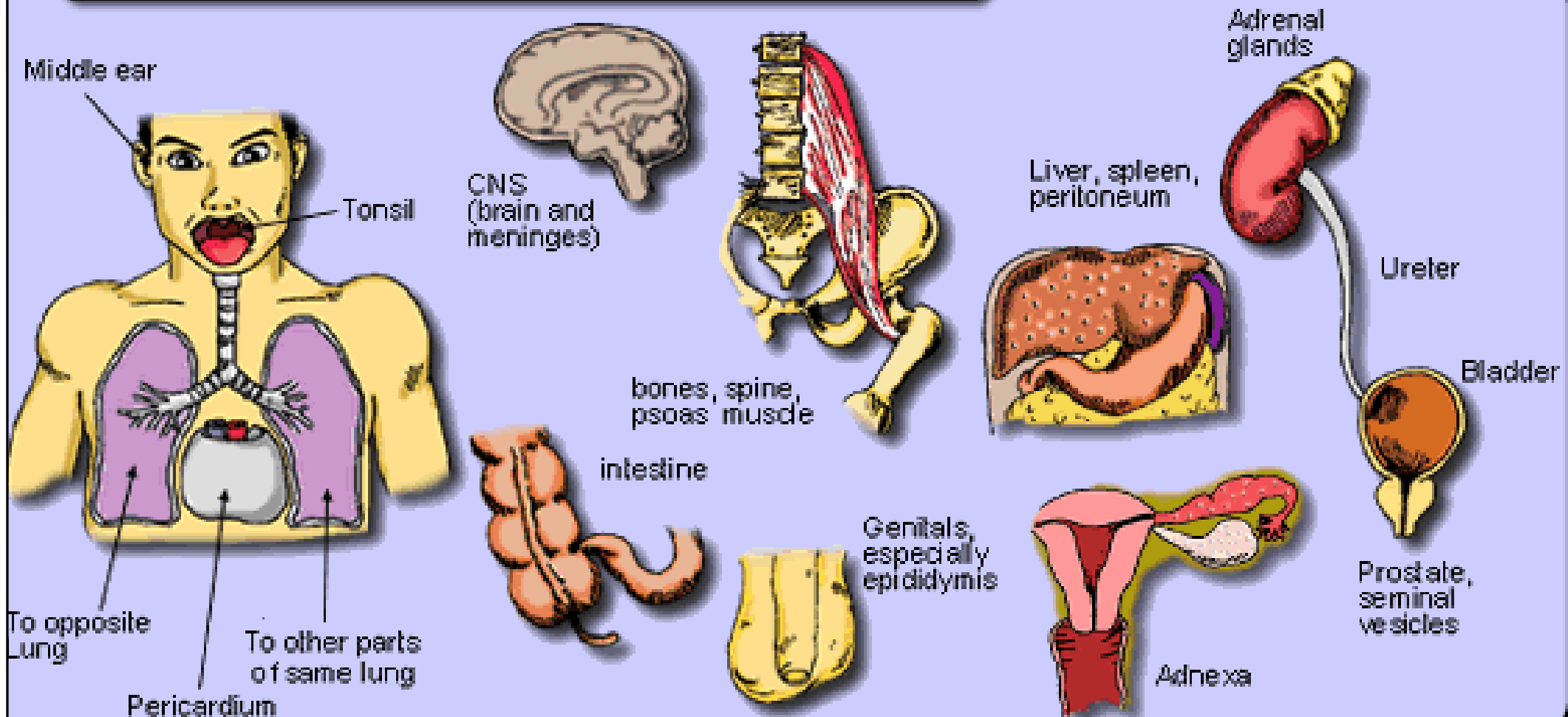
Tuberkulóza



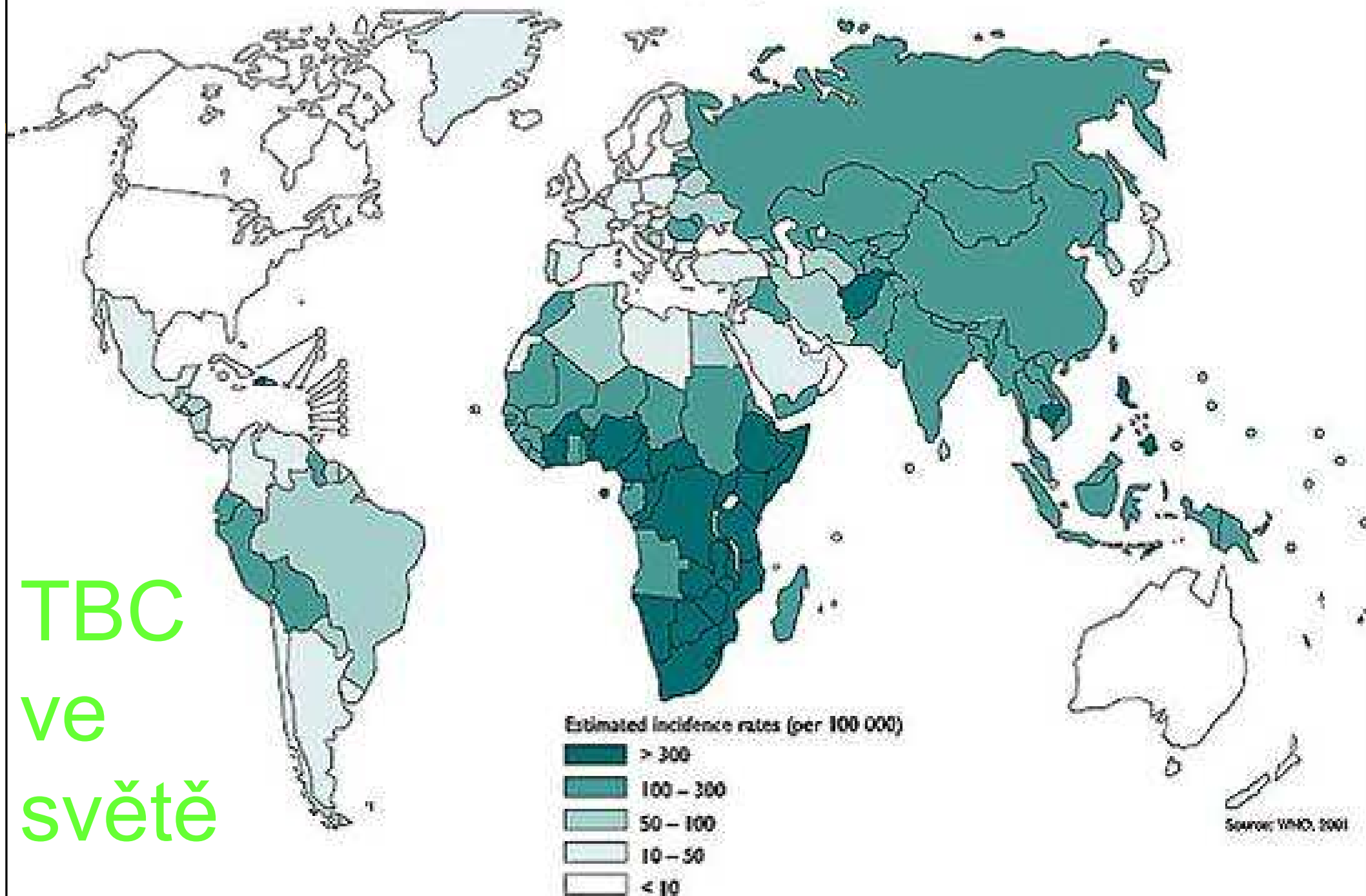
Není jen plicní forma TBC



Tuberculosis Affects Many Parts of the Body



Tuberculosis, 2000



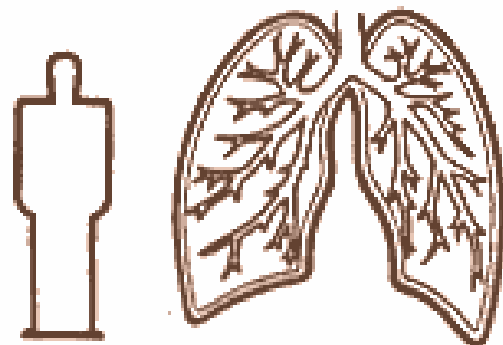
Ještě jednou TBC



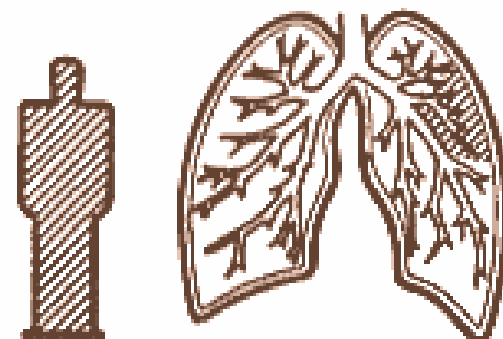
Dist WD Exp
SE 7.4 0

2 µm

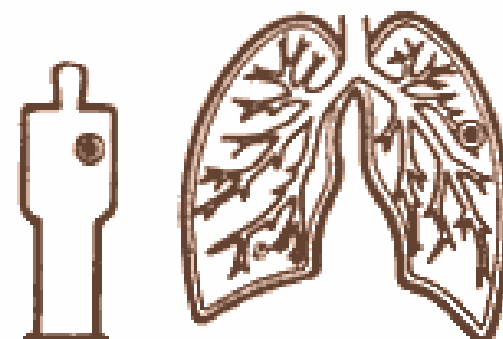
Tuberculosis Develops by Stages



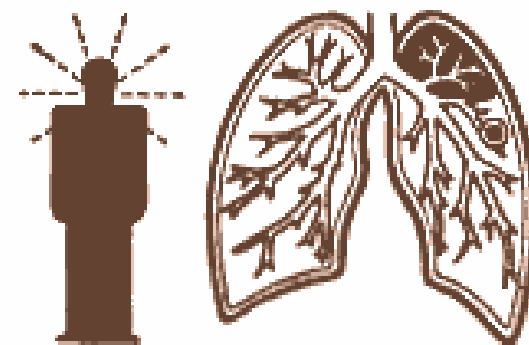
Every person is born with healthy lungs



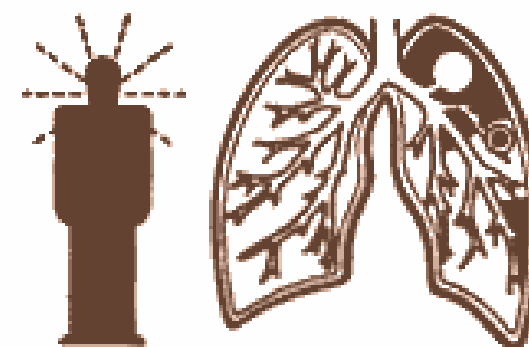
Many of us become infected from other people as we grow up.



The first infection usually heals. The person is well and no germs escape from his lungs. It is important to find this first infection in children.



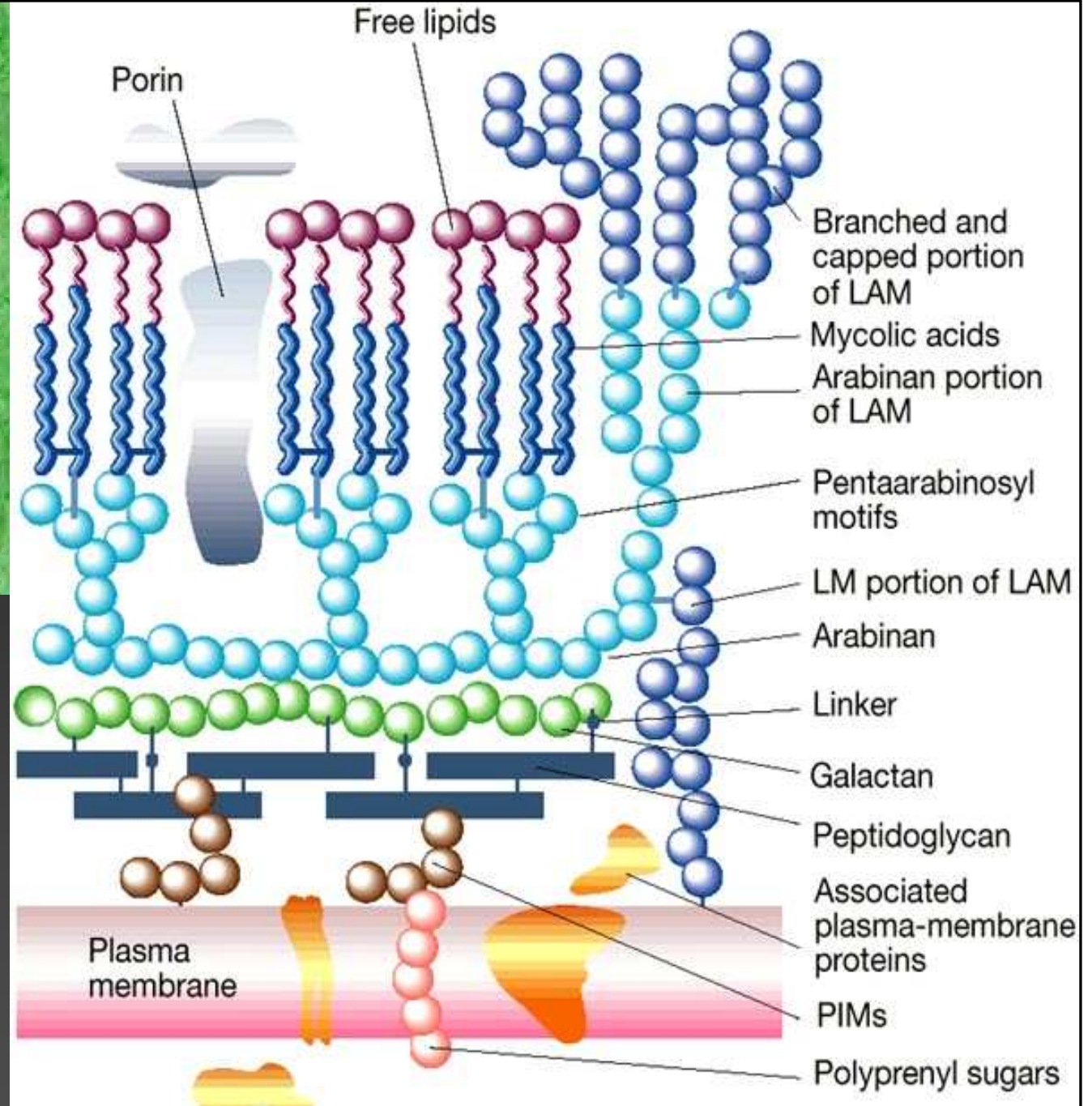
If later a person becomes infected again, the serious disease tuberculosis may begin. The germs that escape from the lungs are likely to infect others.



If tuberculosis is not discovered early, the disease spreads. A hole (cavity) may form in the lung which is an incubator of germs that escape and menace everybody who comes in contact with the sick person.

Další zvláštnosti mykobakterií

- Jejich buněčná stěna je vysoce hydrofobní, jsou v ní tzv. **mykolové kyseliny**. Téměř se nebarví podle Grama, jsou nutná speciální barvení.
- **Roste pomalu**, má dlouhou generační dobu, proto jsou pro kultivaci nutné speciální půdy
- Jsou velmi odolná k **desinfekčním prostředkům**. Nelze použít prostředky spektra „A“, proti běžným bakteriím, je nutné „T“ (proti TBC), případně „M“ (proti atypickým mykobakteriím)
- Jsou též **odolná k antimikrobiálním látkám**.



Buněčná stěna mykobakterií

Příběh druhý

- Pan Hassan žil v pouštní části Súdánu, zmítané neustálými válkami a nepokoji.
- V poslední době se od něj začali odvracet i ti přátelé, kteří ještě neuprchli ani nebyli povražděni. Znetvoření obličeje pana Hassana bylo neklamnou známkou, že pan Hassan trpí onemocněním, které se v těchto zeměpisných šířkách ještě stále vyskytuje až příliš často.
- Naštěstí se pan Hassan setkal s pracovníky jedné nevládní organizace, kterým rovněž byla diagnóza jasná. Pomocí dapsonu se podařilo panu Hassanovi pomoci.

Viníkem je

- *Mycobacterium leprae*, mikrob ještě zvláštnější než tuberkulózní mykobakterium
- Jeho generační doba je ještě výrazně delší. In vitro kultivace se podařila teprve nedávno a trvala celý jeden rok
- Základní léčba lepry není drahá, bohužel v zemích, kde se lepra vyskytuje, je i tato poměrně nízká cena příliš vysoká
- Proto se problémem lepry zabývá řada nadací, nevládních a charitativních organizací a podobně.

Lepra



Jiná mykobakteria



- Kromě *M. tuberculosis* a *M. leprae* existuje i spousta **dalších mykobakterií**. Některá, např. *Mycobacterium marinum*, patří mezi tzv. **atypická mykobakteria**, která občas způsobují infekce ran a jiné problémy. **Některá mykobakteria jsou nepatogenní** a jsou normální součástí lidské mikroflóry, např. *M. smegmatis* – viz obrázek

Příběh třetí

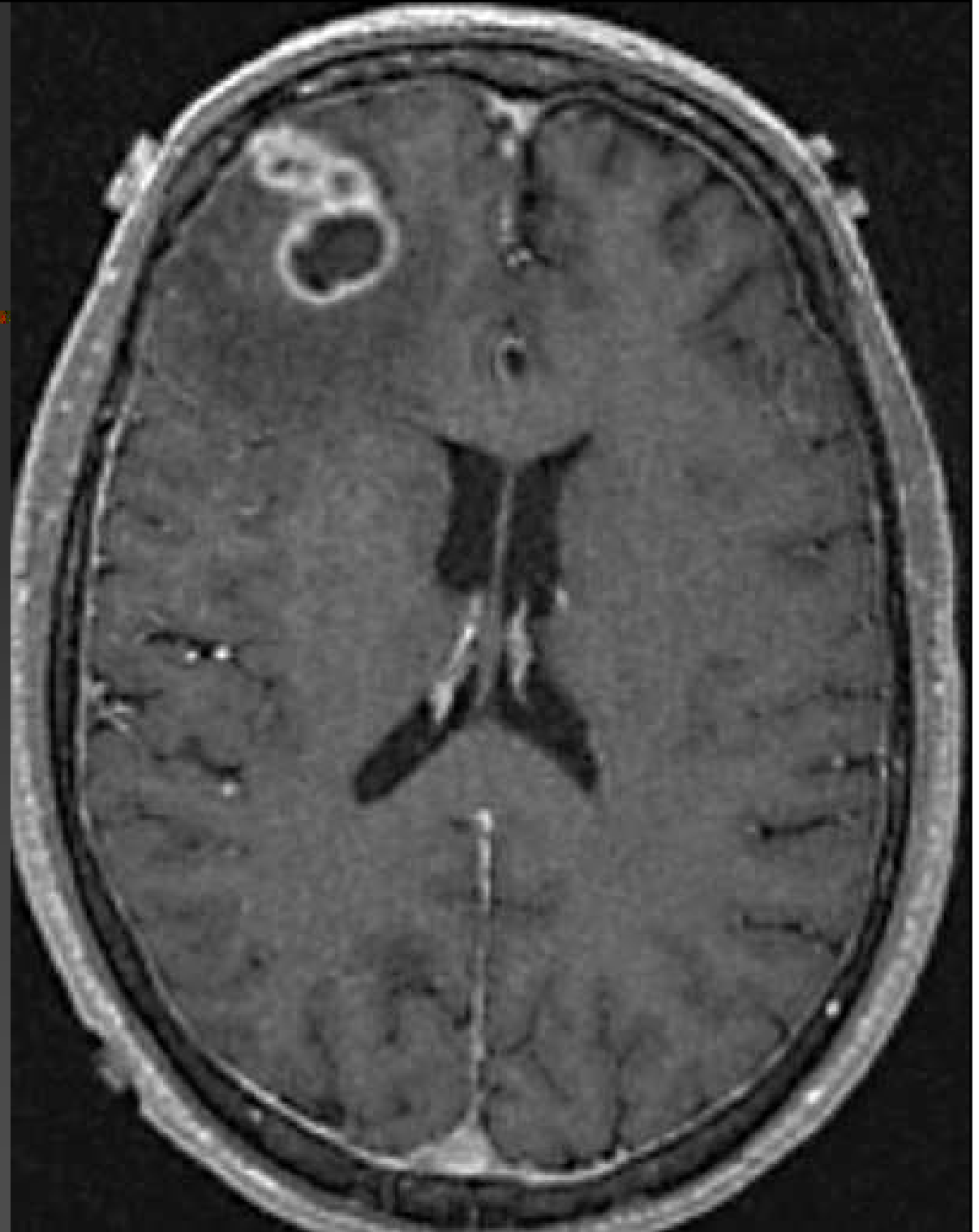
- Paní Píšťelková si už delší dobu hmatala pod kůží krku **drobné útvary**
- Nedávno se stalo, že jeden z těchto útvarů se **otevřel na povrch** a v ústí se objevil velmi hustý, žlutý páchnoucí hnis. To už paní Píšťelkovou donutilo zajít k lékaři.
- Lékaři poslali **hnis na mikrobiologické vyšetření**. Vyšetření **trvalo dlouho** – paní Píšťelková už spílala mikrobiologům, že si tam někde válejí šunky. Nakonec se ukázalo, že...

...jde o aktinomykózu



- tedy že viníkem je *Actinomyces* sp.
- Aktinomycety jsou vláknité bakterie, v podstatě grampozitivní, ale barví se Gramem špatně, protože jejich buněčná stěna je hodně hydrofobní a obsahuje hodně mykolových kyselin
- Aktinomycety se běžně vyskytují v ústní dutině zdravých osob. Odtud se za různých okolností mohou dostat do měkkých tkání krku, tváře či hrudníku. Jsou to anaerobní bakterie
- Podobné aktinomycetám jsou nokardie, které jsou naopak striktně aerobní. Jinak však mají hodně podobné vlastnosti.

Nokardióza mozku na CT



Acidorezistence a alkalirezistence

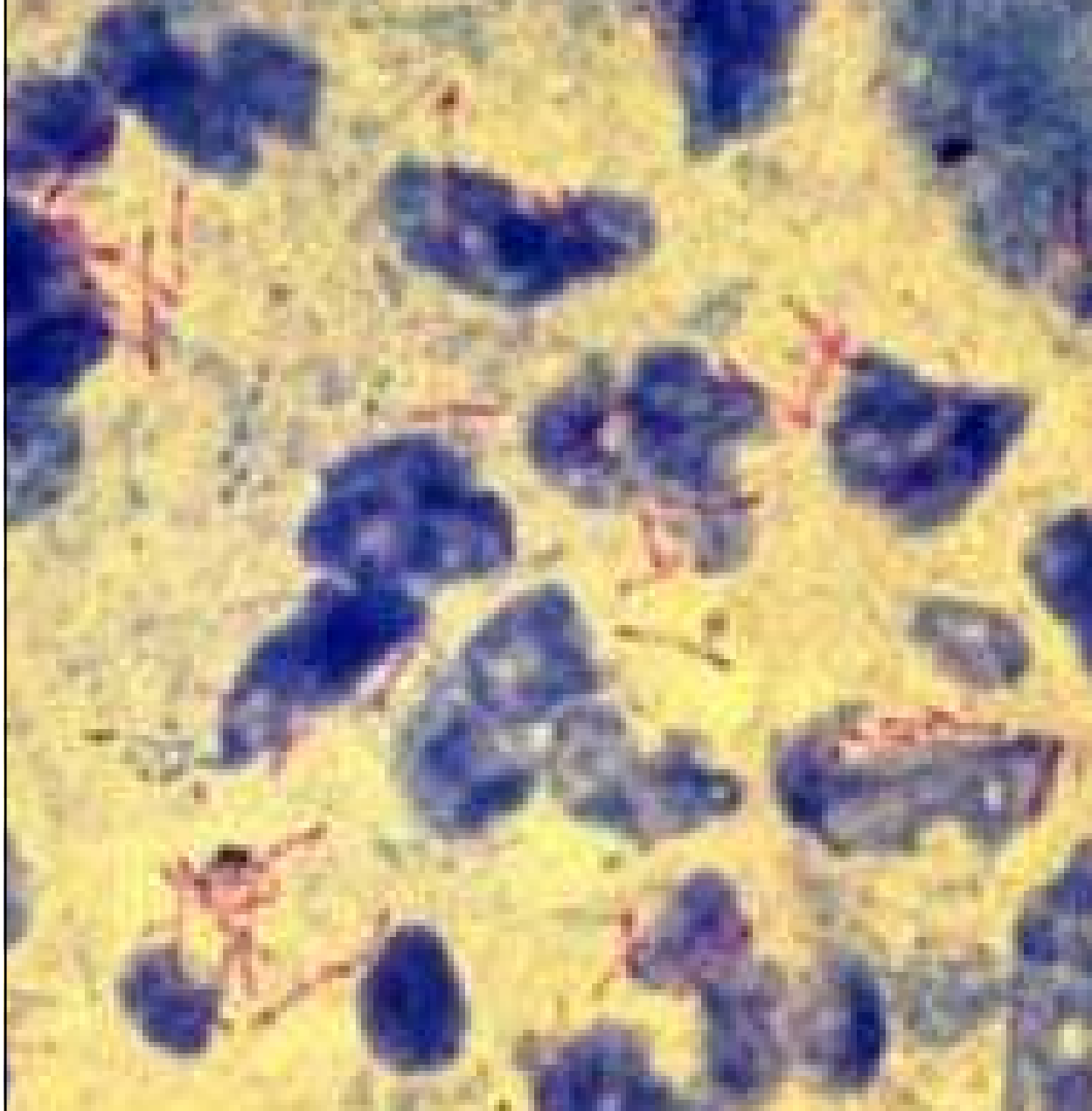
- Aby mohly na něco působit kyseliny či alkalie, musí to „něco“ být hydrofilní, tedy komunikovat s vodným prostředím. Pro mykobakteria však tohle neplatí.
- Nejsme tedy schopni je kyselinami či alkaliemi ničit
- Nejsme také schopni je kyselinami odbarvovat, pokud tedy se je nějakým zázrakem podařilo obarvit
- Totiž: většina barviv je také hydrofilních, a tudíž **se mykobakteria i špatně barví**, zpravidla je nutno barvit je za horka, aby se vůbec obarvila
- **Nokardie a aktinomycety** jsou na rozdíl od mykobakterií **acidorezistentní jen zčásti**. Barvíme je proto podle Grama, ale musíme počítat s tím, že se barví nerovnoměrně a špatně.

Co z toho vyplývá pro klinika?

- Pokud klinik pošle vzorek (sputum, moč, hnis či cokoli jiného) „na bakteriologickou kultivaci“, nemůže očekávat, že vyšetření odhalí případnou přítomnost mykobakterií
- Chce-li klinik zjistit, zda má pacient TBC, musí poslat vzorek zvlášť a na průvodce výrazně označit, že má být vyšetřen kultivačně či PCR na tuberkulózu. V tom případě laboratoř provede příslušné procedury
- Sérum na protilátky proti TBC také posílat nelze, protilátková odpověď je velmi špatná.

Defilé zločinců:

Mycobacterium tuberculosis



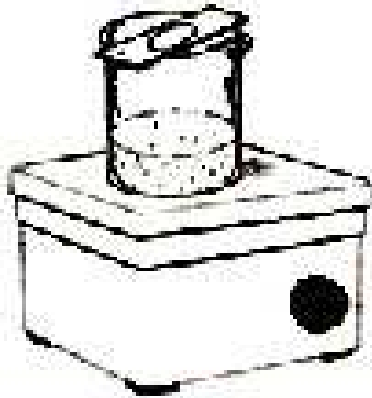
Jak pátrat mykobakteriích

- **Mikroskopie:** Používá se Ziehl-Neelsenovo barvení a fluorescenční barvení
- **Kultivace:** Používá se speciálních půd, přičemž před vlastní kultivací předchází **moření, obvykle louhem**. Cílem moření je **usmrtit ostatní bakterie**, které by při svém rychlém růstu byly kultivačně úspěšnější. Alkalirezistentní mykobakteria moření ruče přežijí.
- **Automatická kultivace:** Používá se různých typů kultivačních automatů: mohou detekovat kultivační pozitivitu mnohem dříve než klasická kultivace
- **Biochemické rozlišení** je možné, je však vyhrazeno specializovaným laboratořím
- **Pokus na zvířeti:** občas se používá **morče**
- **PCR diagnostika** se stává čím dál důležitější

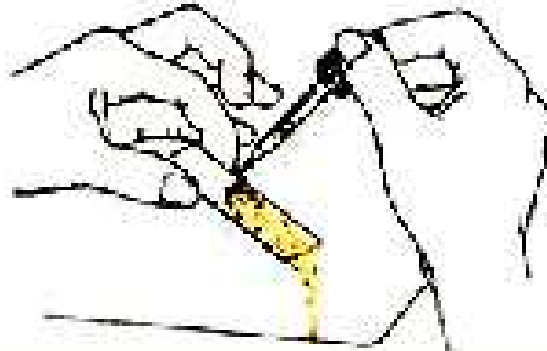
PCR kit pro diagnostiku TBC



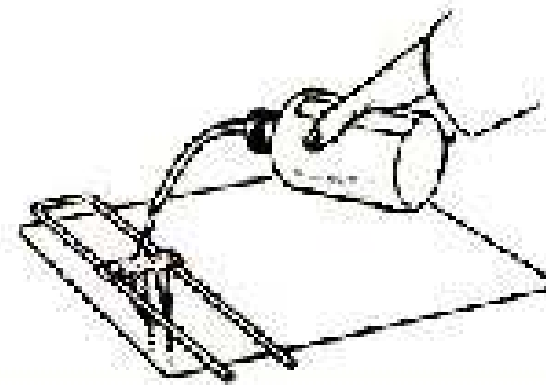
Ziehl-Neelsenovo barvení



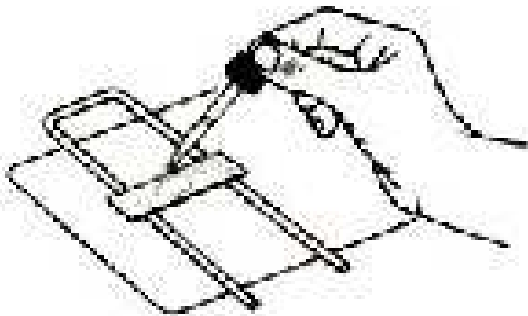
1 Cover smear with carbol-fuchsin. Steam over boiling water for 8 minutes. Add additional stain if stain boils off.



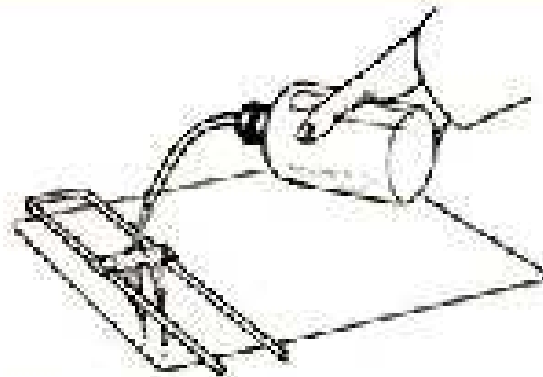
2 After slide has cooled decolorize with acid-alcohol for 15 to 20 seconds.



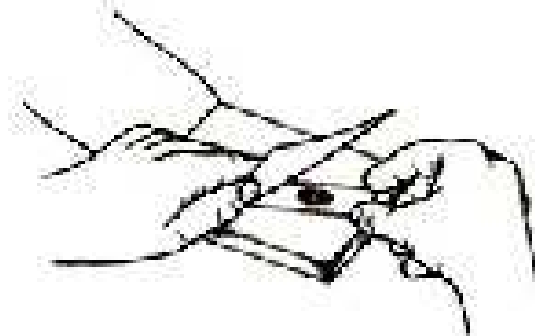
3 Stop decolorization action of acid-rinsing briefly with water.



4 Counterstain with methylene blue for 30 seconds.



5 Rinse briefly with water to remove excess methylene blue.



6 Blot dry with bibulous paper. Examine directly under oil immersion.

Ziehl-Neelsen acid-fast staining procedure

Úkol 1: Barvení dle Ziehl-Neelsena

Úkol 2: Prohlédnutí preparátů

- **V prvním kroku** barvíme karbolfuchsinem (Gabbetem) za horka až do výstupu par. Bez zahřívání by mykobakteria vůbec nešlo obarvit.
- **V druhém kroku** odbarvujeme „kyselým alkoholem“, což je směs alkoholu s minerální kyselinou, nejčastěji kyselinou chlorovodíkovou
- **Ve třetím kroku** dobarvujeme pozadí, tj. vše, co jsme ve druhém kroku odbarvili. Dobarvujeme **malachitovou zelení** nebo **metylenovou modří**.
- **Výsledkem** jsou červené acidorezistentní tyčinky na **modrém** nebo **zeleném** pozadí

Ziehl-Neelsenovo barvení



Úkol 3: Kultivace mykobakterií

- Před kultivací musí být provedeno moření
- Používáme tekutou půdu Šulovu či Baničovu a vaječné půdy Ogawovu či Löwenstein-Jenssenovu. Vaječné půdy jsou tuhé vzhledem ke koagulaci vaječného bílku – neobsahují agar
- I pevné půdy se nalévají do zkumavek a uzavírají zátkou. Není to jen kvůli ohrožení personálu, ale především kvůli vyschnutí půdy.
- Výsledky se odečítají po 3, 6 a pro jistotu i 9 týdnech kultivace.

Vzhled kolonií mykobakterií



V úkolu 3 si prosím přikreslete dvě zkumavky!

3a

Tekutá Šulova půda
negativní

3a

Tekutá Löwenstein-
Jenssenova půda
negativní

3b

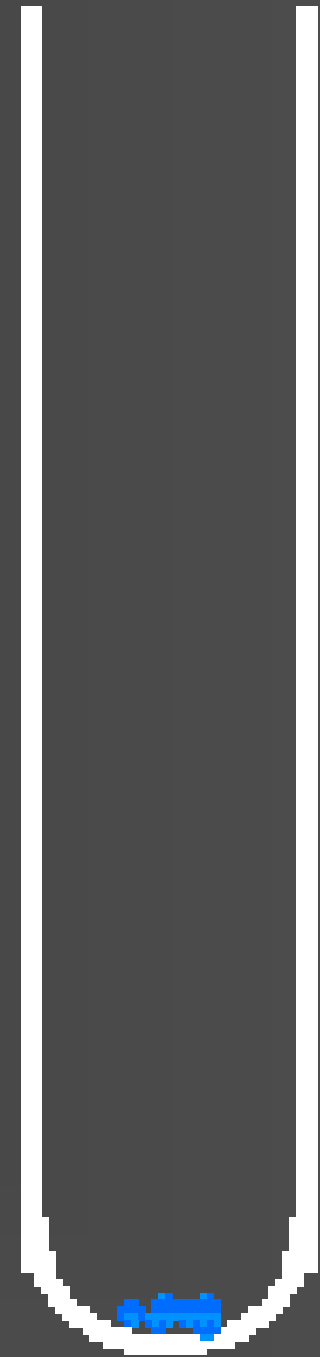
Tekutá Šulova půda
pozitivní (rostou
mykobakteria)

3b

Tekutá Löwenstein-
Jenssenova půda
pozitivní

K tekuté Šulově půdě

- I pozitivní zkumavka je na první pohled čirá, protože nárůst mykobakterií je patrný jen u dna („modrej bordel“, jak to trefně označila studentka J. H. 😊)



Úkol 4 – testy antituberkulotické citlivosti (nikoli antibiotické!)

- Nelze používat difúzní diskové testy
- Antituberkulotika přidáváme přímo do kultivační půdy
- Antituberkulotika jsou zvláštní látky, až na výjimky odlišné od antibiotik
- Vždy se užívají kombinace tří či čtyř: rychle totiž vznikají rezistence, navíc některá působí jen intra- a jiná zase extracelulárně

Přehled běžně užívaných antituberkulotik

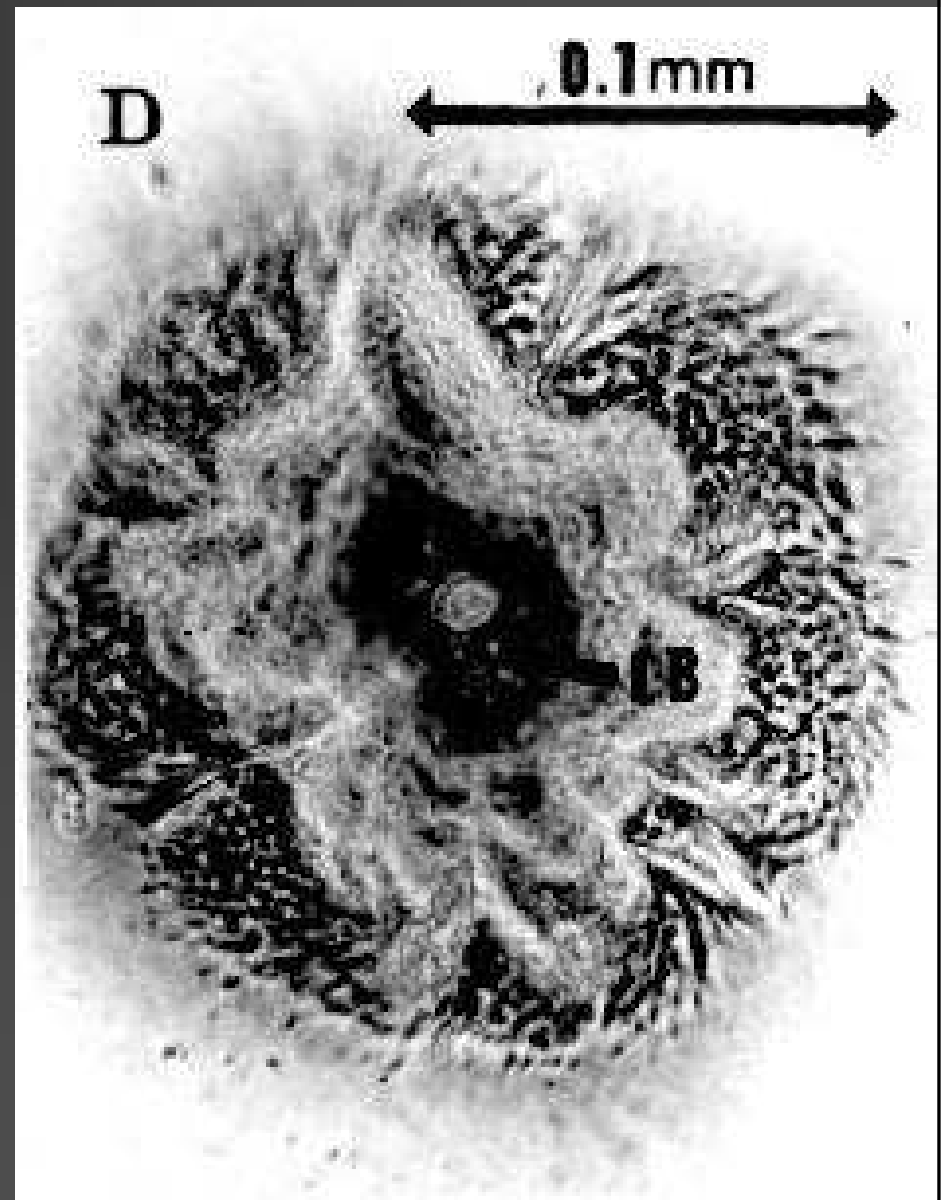
Antibiotikum	Zkratka
Isoniazid	H, INH
Ethambutol	E
Rifampicin	R
Pyrazinamid	Z
Streptomycin	S, STM

Tuberkulózní játra
pokusného morčete



Úkoly 5 a 6 – mikroskopie a kultivace nokardií

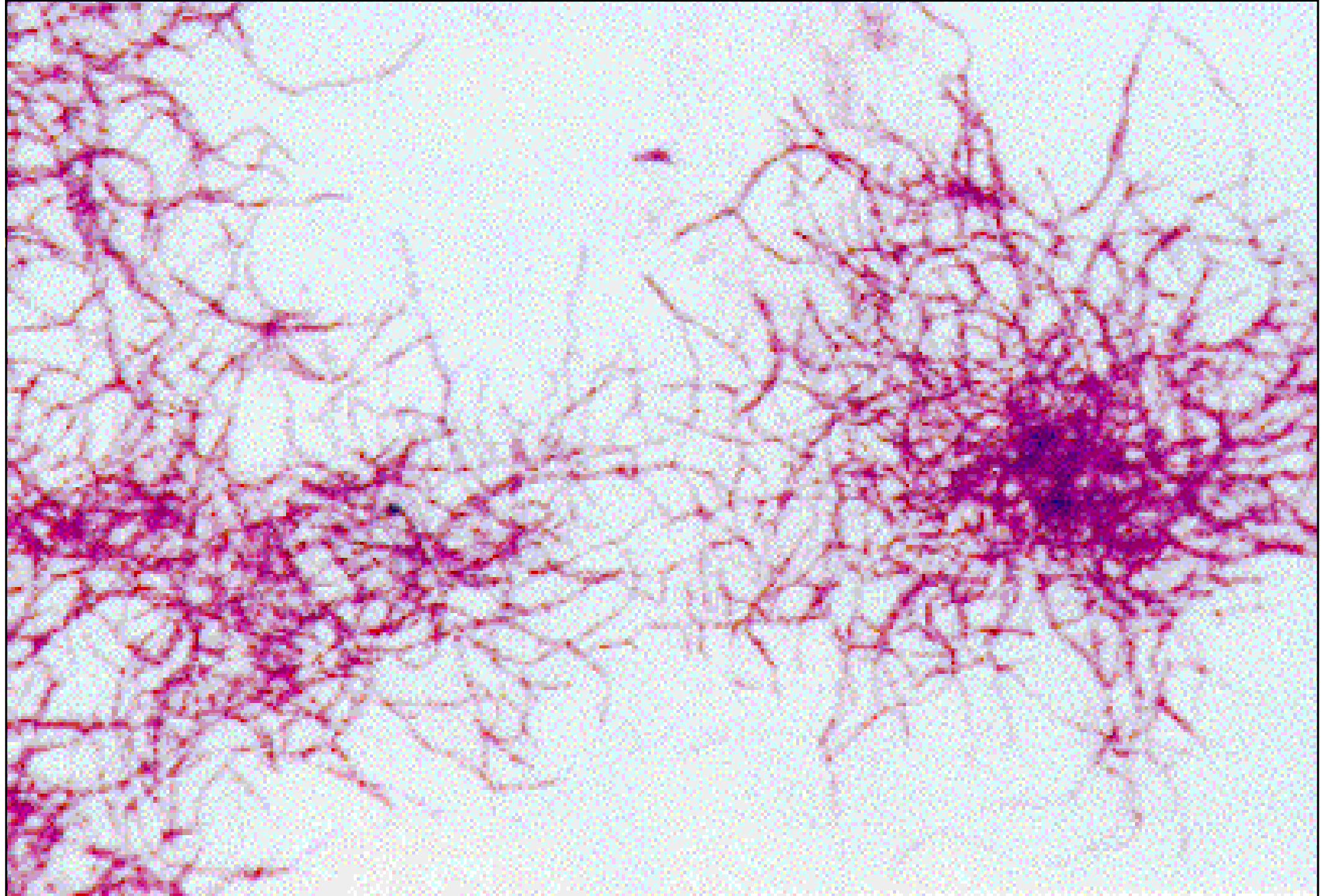
- V úkolu 5 popište preparáty barvené podle Grama
- V úkolu 6 popište kolonie na KA a krevním VL agaru. Všimněte si, které bakterie rostou za aerobních podmínek a které za anaerobních



Úkol 7 – testy antibiotické citlivosti

- **Antibiotická citlivost** se na rozdíl od mykobakterií dá u nokardií a aktinomycet stanovit difusním diskovým testem. Musíme ale počítat s tím, že rostou pomalu a špatně.

Odečtěte citlivost – hraniční zóny naleznete v materiálech na stole



Použity obrázky z adres:

01-02 www2.bc.cc.ca.us/bio16/20_Nervpictures.htm.

03 07 <http://www.health.qld.gov.au/EndoscopeReprocessing/Module13d.htm>

08 <http://medicineworld.org/images/blogs/mycobacterium-tuberculosis-299290.jpg>

09 <http://oregonstate.edu/~mahmudt/pictures/Mycobacterium%20cell%20envelope.jpg>

10 <http://www.cinnagen.com/images/mycobacterium%2520tuberculosis%2520diagnostic%2520kit.jpg>

11 http://www.hhmi.org/news/popups/hatfull_jacobs20051202-esp_pop.html

12 13 www.primer.ru/std/gallery_std2/m_tub.htm.

14 <http://www.cbc.ca/story/science/national/2006/03/17/tb-who060317.html?ref=rss>

15 <http://www.niaid.nih.gov/dmid/tuberculosis/tbcongress/>

16 www.tusalud.com.mx/120607.htm.

17 18 19 sitemaker.umich.edu/medchem13/files/tb.htm.

20 www.bikupan.se/tuberculosis/tuberc.html.

21 textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html

22 <http://www.stockmedicalart.com/medicalartstudio/kfolio/images/tuberculosis.jpg>

23 http://www.lung.ca/tb/images/full_archive/138_infection_stages.gif

24 tuberculosis.upmc.com/.

25 <http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/images/d7124.jpg>

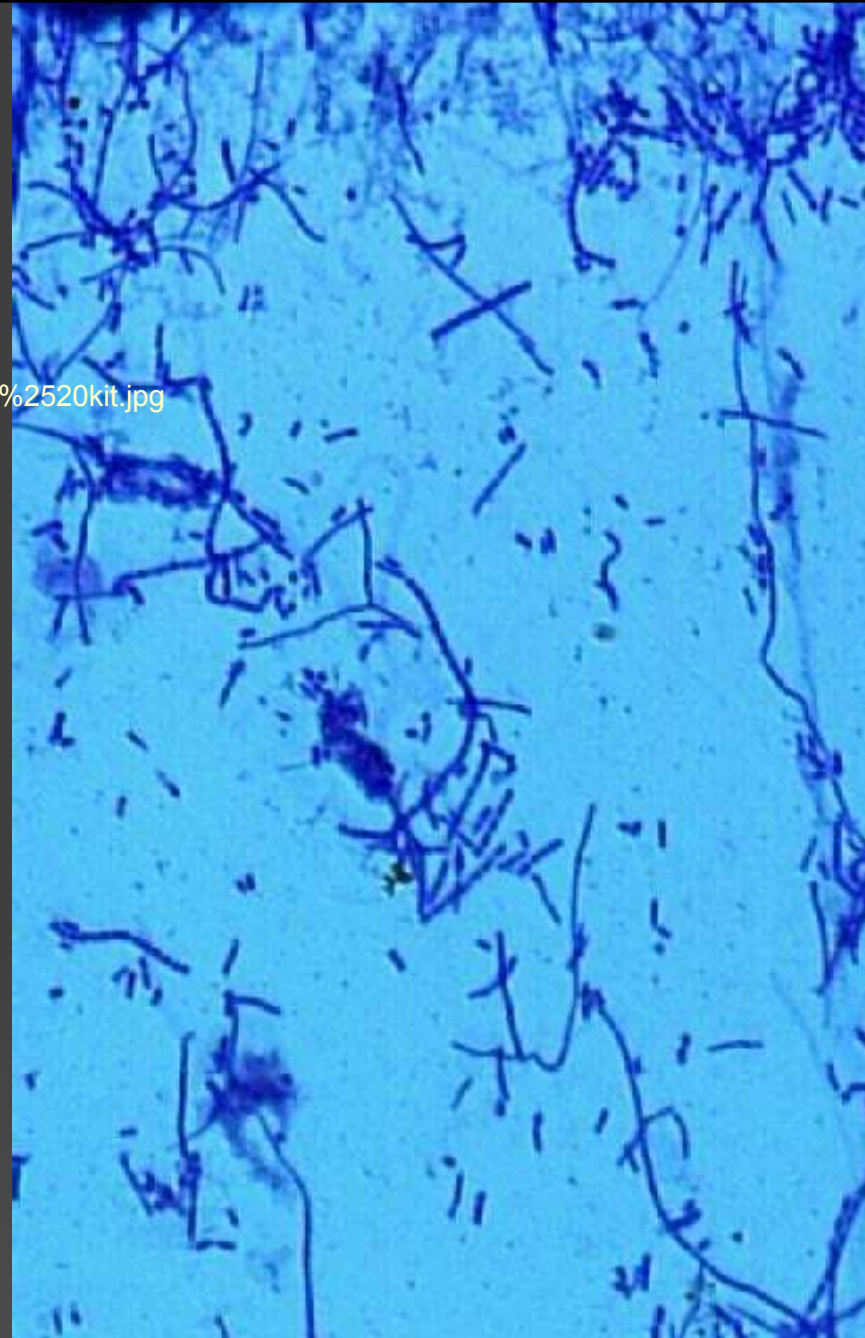
26 <http://en.wikipedia.org/wiki/Actinomyces>

27 http://rbp.fmrp.usp.br/didatico/microbiologia/Micologia_files/image087.gif

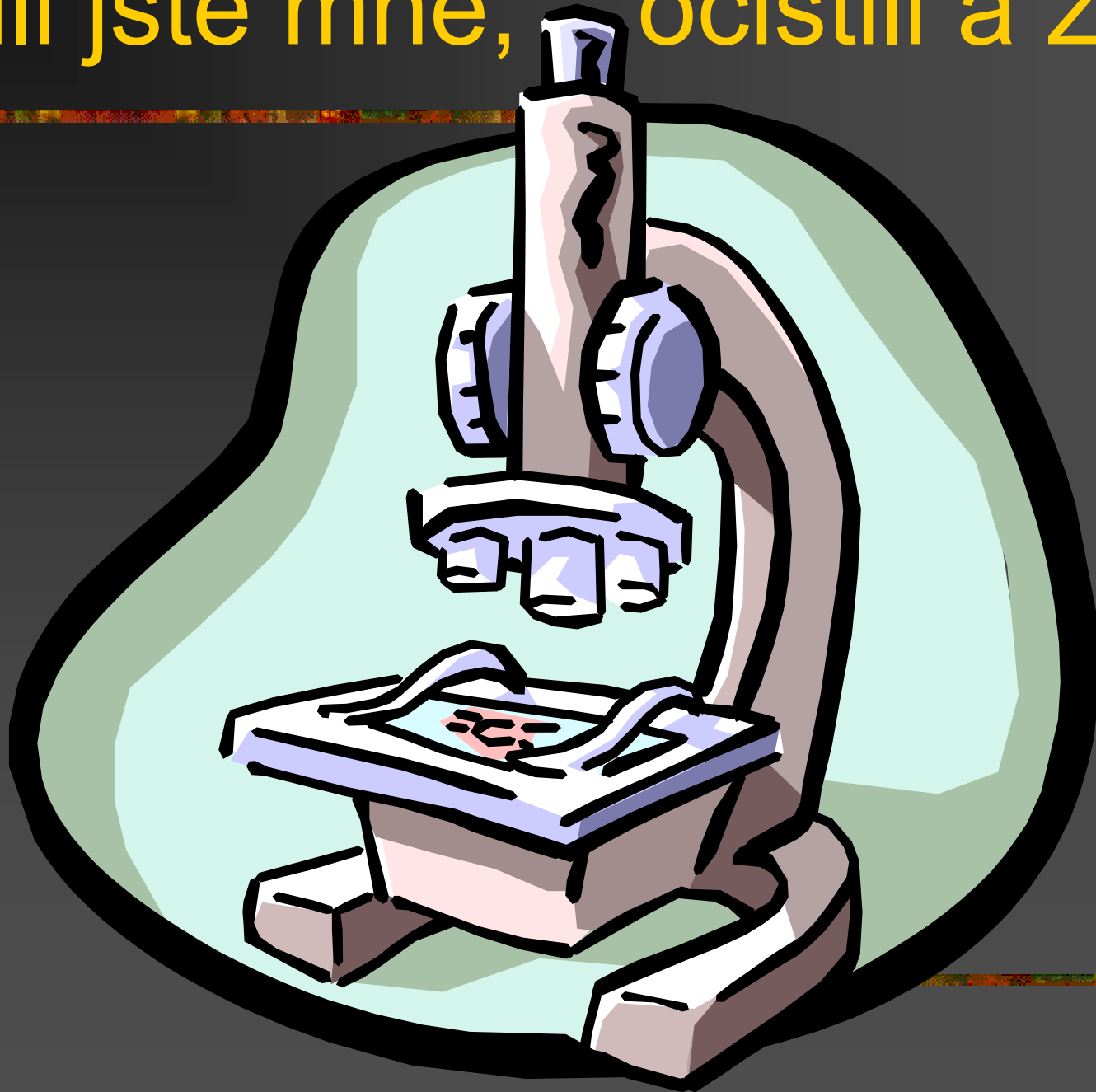
28 http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Microbes/nocardia.jpg

29 http://www.appliedradiology.com/Documents/Cases/images/Pugatch_Figure04B.jpg

30 - 31 <http://www2.mf.uni-lj.si/~mil/bakt4/bakt4.htm>



Už mne nebudete potřebovat!
Vypnuli jste mne, očistili a zakryli?





Než opustíte
praktikárnu...

...pláště laskavě nepohazujte po
praktikárně, nýbrž je pověste na
věšák tak, aby nespadly.

Logo jednoho
kongresu o TBC



Nashledanou při
dalším dílu!