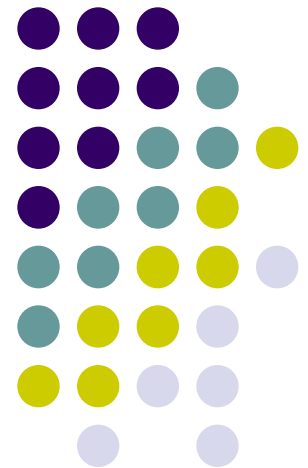

Acidorezistentní bakterie



- 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 (acidorezistentní bakterie, spirochéty)

- Jaké znáte způsoby získání anaerobiózy?

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

- Které rody bakterií tvoří endospóry?

Bacillus, Clostridium

- Jaká znáte patogenní klostridia?

C. tetani, C. botulinum, C. perfringens ad.

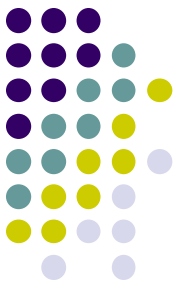
- Který toxin se prokazuje na žloutkovém agaru?

Lecitináza *Clostridium perfringens*

- Uveďte pár příkladů nesporulujících anaerobů.

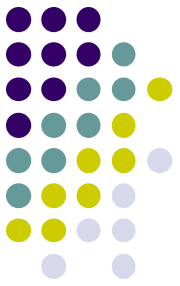
Bacteroides fragilis, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, Veillonella, atd.

Rod *Mycobacterium*



- G+ nepohyblivé krátké rovné či lehce zahnuté tyčky, vzácně větvcí se formy
- obligátně aerobní, acidorezistentní i alkalorezistentní
- dlouhá generační doba (15-20 hodin), růst na speciálních kultivačních půdách několik týdnů (4-6)
- vysoce hydrofóbní buněčná stěna s tzv. mykolovými kyselinami, nelze barvit dle Grama
- schopnost přežívat uvnitř makrofágů – významnou roli při infekci hraje tedy buněčná imunita
- odolné k vysychání a chemickým látkám
- patogenní druhy: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*





- **Pomalu rostoucí druhy:**

M. tuberculosis, M. leprae

- **Rychle rostoucí druhy:**

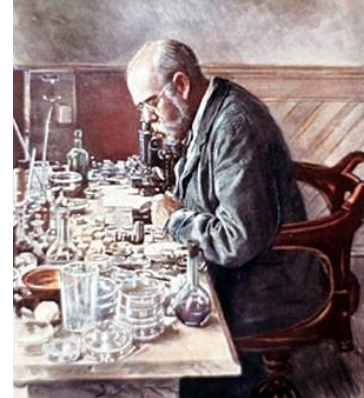
podmíněné patogeny či saprofytické
druhy (*M. fortuitum, M. chelonae*)

cca 7 dní

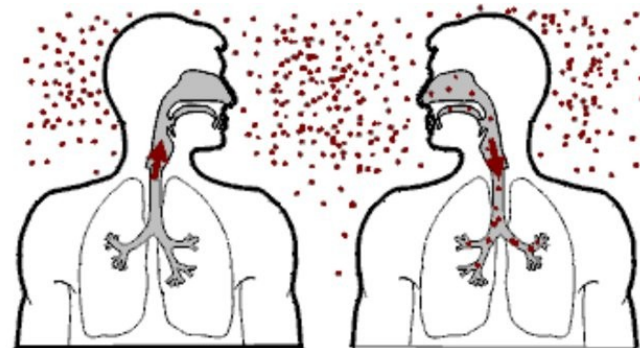
Tuberkulóza (TBC)

Původci TBC:

- *Mycobacterium tuberculosis* (Kochův bacil, BK)
- *M. bovis* - tuberkulóza krav, vzácně i lidí – infekce z nepasterizovaného mléka, TBC krčních a mesenterálních lymfatických uzlin
- *M. africanum*- vzácně, TBC v tropické Africe



- Asi 1/3 populace nakažena.
- Infekce se projeví jen asi u 10% osob.

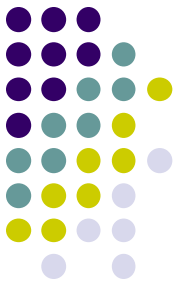
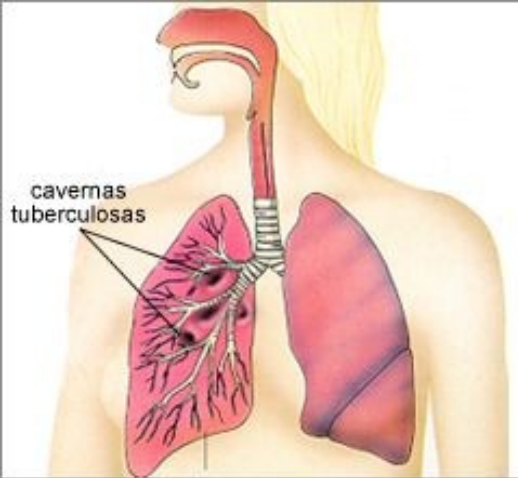


Patogeneze onemocnění

I. Primární TBC

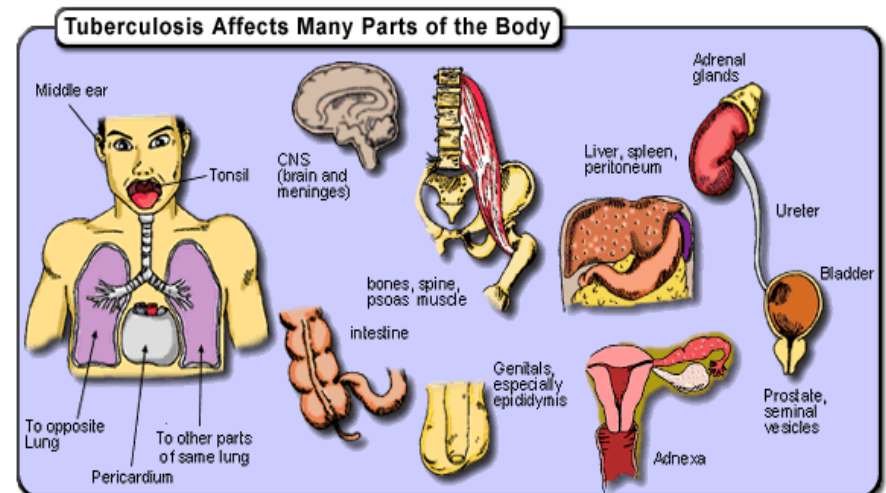
- mykobakterie se dostávají do plic (méně často přes zažívací trakt či rány) a zde se množí do rozvoje buněčné imunity, poté dochází k centrální nekróze, vzniká granulační tkáň – **granulom** (lymfocyty, epiteloidní b.),
- mykobakteria se šíří do regionálních mízních uzlin a vytváří se tzv. **Primární tuberkulózní komplex**
- za klinické příznaky je zodpovědná imunitní reakce organismu

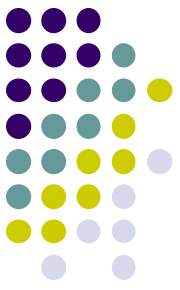




Další průběh primární TBC:

- Spontánní celkové zhojení
- Granulom v plicích kaseifikuje či kavernizuje-latentní forma
- Hematogenní šíření- do různých orgánů. Miliární tuberkulóza- napadá několik míst zároveň (v ledvinách, mozku a kostech)

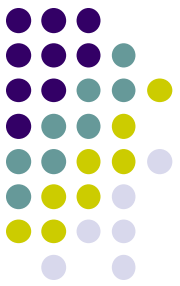




II. Postprimární TB

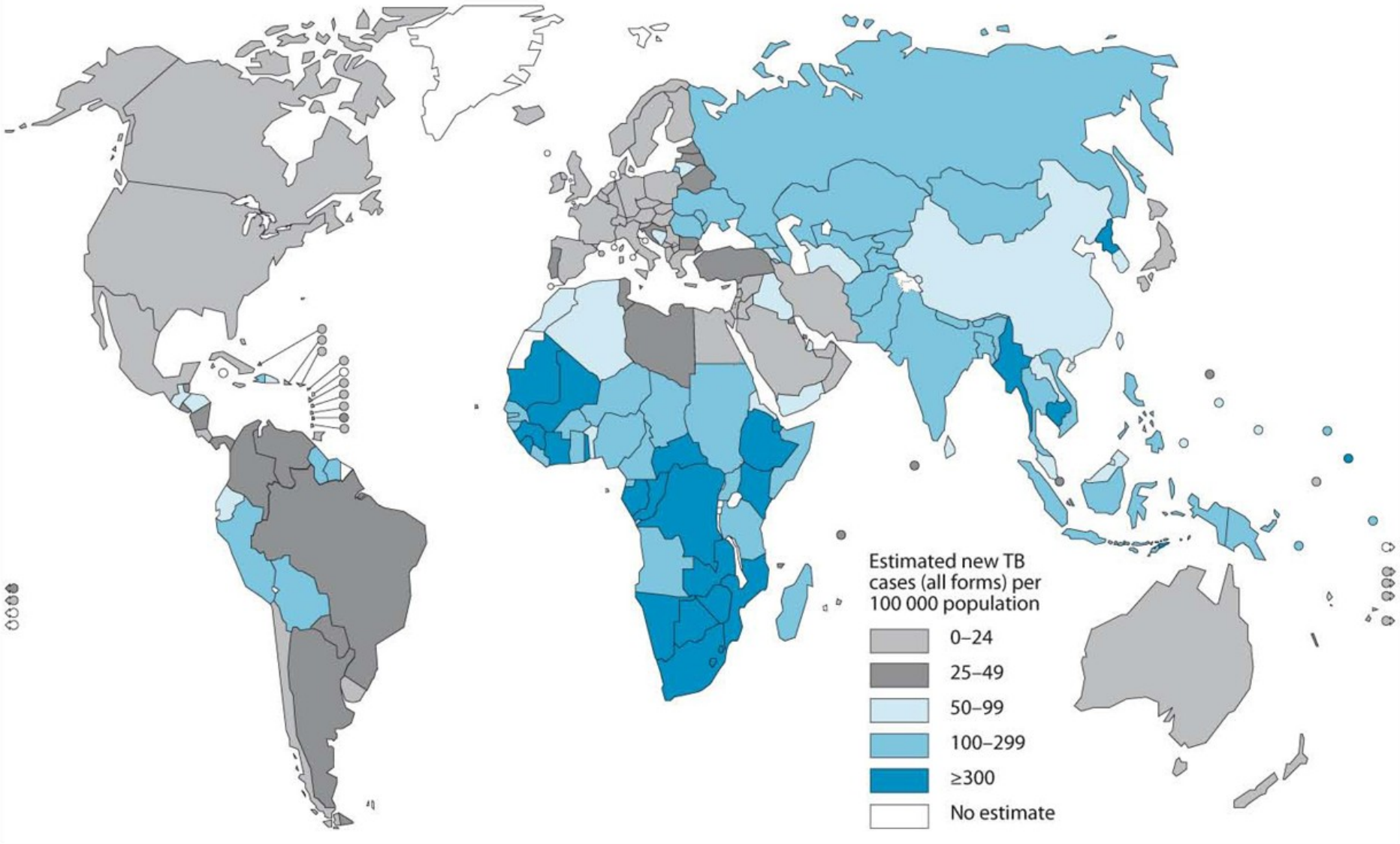
- u osob infikovaných řadu let po primoinfekci (asi u 10%)
- vzniká za předpokladu:
 - Exogenní infekce- inhalací mykobakterií
 - Progrese primární infekce
- tzv. otevřená tuberkulóza (tuberkulom)
- může probíhat bezpříznakově, ale u většiny viditelné symptomy (kašel, hemoptysa, zvýšená teplota, hubnutí,...), zasahuje většinou plíce

Léčba TBC



- Podávání kombinace několika **antituberkulotik** – zamezení vzniku rezistentních mutant
- Nejčastěji používaná: **isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol, streptomycin**
- Obvykle 4- 12 měsíců- fáze:
 - Iniciální- snížení počtu bakterií
 - Pokračovací- sterilizace ložiska
- **Multirezistentní TB** (MDR TB)- onemocnění vyvolané kmenem *M. t.* rezistentním minimálně na kombinaci isoniazid a rifampicin
- Očkování- BCG vakcína

Estimated TB incidence rates, by country, 2009

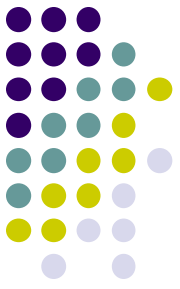


The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities,

Source: *Global Tuberculosis Control 2010*. WHO, 2010.



Mycobacterium leprae



- Původce lepry
- Jeho generační doba je ještě výrazně delší (12-14 dní)
- In vitro kultivace se podařila teprve nedávno a trvala celý jeden rok
- Postihuje periferní nervy- váže se na povrch Schwannových buněk a ty kolonizuje (v kůži, podkoží, na obličeji, v kostech prstů)
- Základní léčba lepry není drahá (dapson, rifampicin) bohužel v zemích, kde se lepra vyskytuje, je i tato poměrně nízká cena příliš vysoká

Lepra

Dlouhá ID- 2-3, 7 a více let

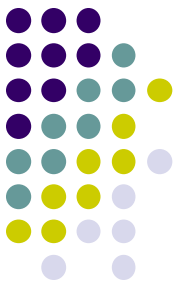
Tuberkuloidní lepra

- na kůži necitlivé depigmentované skvrny, zduřelé periferní nervy
- výrazná celulární imunita
- spontánní zhojení

Lepromatózní lepra

- nedostatečná celulární imunita
- dochází ke splývání a zduření kožních lézí
- obočí vypadává, propadá se nos, slepota, ztráta prstů



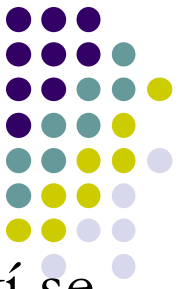


Atypická mykobakteria

- 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 (fish tank granuloma, swimming pool granuloma).
- Některá jiná mykobakteria jsou nepatogenní a jsou normální součástí lidské mikroflóry, např. *M. smegmatis*



Actinomyces israelii

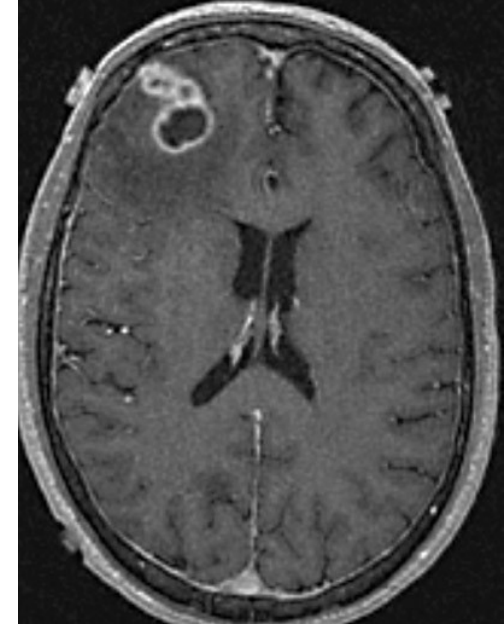
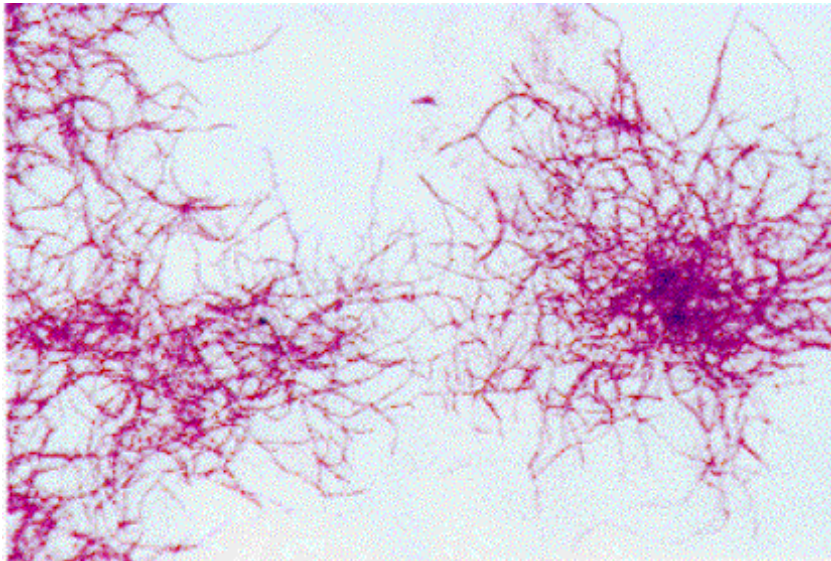
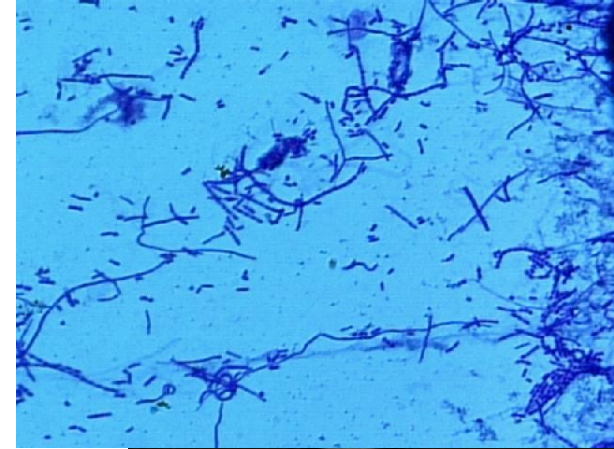


- **vláknité** bakterie, v podstatě **grampozitivní**, ale barví se Gramem špatně, protože jejich buněčná stěna je hodně hydrofobní a obsahuje hodně mykolových kyselin
- běžně se vyskytují v **ústní dutině zdravých osob**, odtud se za různých okolností mohou dostat do měkkých tkání krku, tváře či hrudníku- **aktinomykóza** (abscesy)
- jsou to **anaerobní** bakterie
- podobné aktinomycetám jsou nokardie, které jsou naopak striktně aerobní, jinak však mají hodně podobné vlastnosti

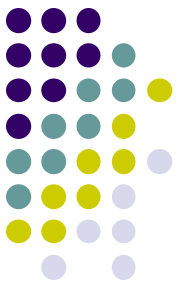


Nocardia asteroides

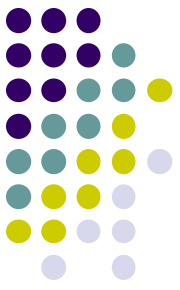
- G+ aerobní, půdní bakterie
- U lidí s oslabenou T-imunitou - lokalizované infekce plic, diseminace - mozkové abscesy
- Tropy (*N. brasiliensis*) – podkožní abscesy



Detekce mykobakterií



- **Mikroskopie:** Používá se **Ziehl-Neelsenovo** 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 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
- **PCR** diagnostika se stává čím dál důležitější



- 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, (přesněji: lze, ale je to na kočku), protože protilátková odpověď je velmi špatná.

Úkol 1a: Barvení dle Ziehl-Neelsena



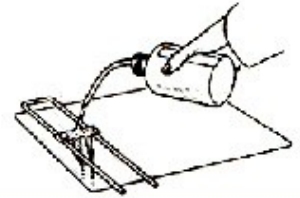
- V prvním kroku barvíme karbolfuchsinem za horka až do výstupu par, bez zahřívání by mykobakteria vůbec nešlo obarvit.
- V druhém kroku odbarvujeme „kyselým alkoholem“, což je směs alkoholu s minerální kyselinou, nejčastěji HCl
- Ve třetím kroku dobarvujeme pozadí, tj. vše, co jsme ve druhém kroku odbarvili.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



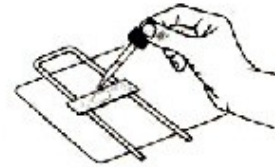
1 Cover smear with carbolfuchsin. Steam over boiling water for 8 minutes. Add additional stain if stain boils off.



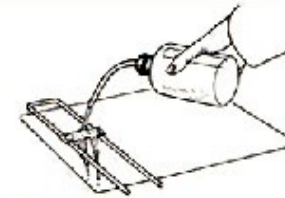
2 After slide has cooled decolorize with acid-alcohol for 15 to 20 seconds.



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



4 Counterstain with methylene blue for 30 seconds.



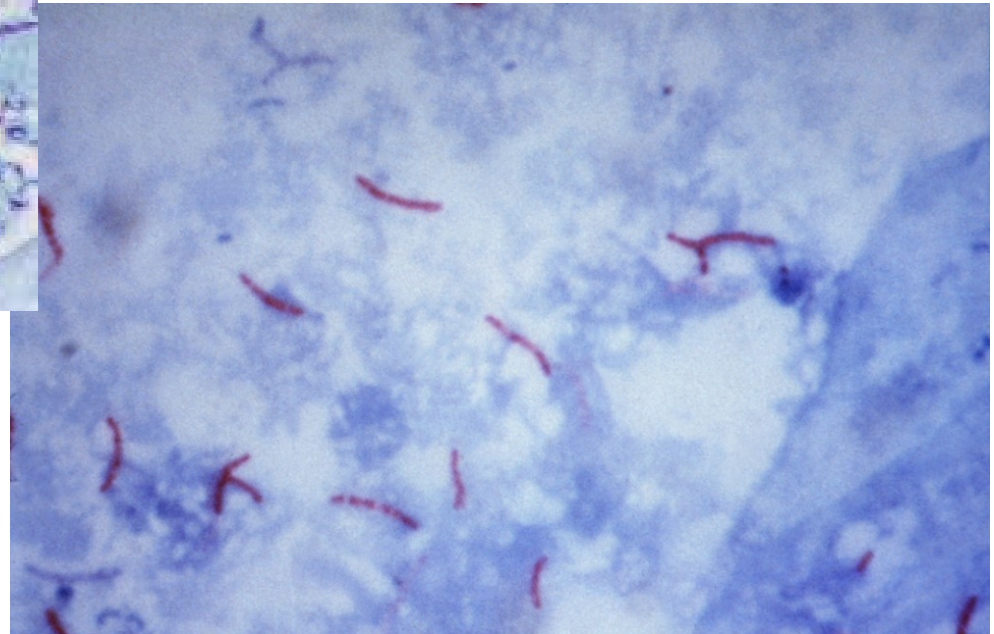
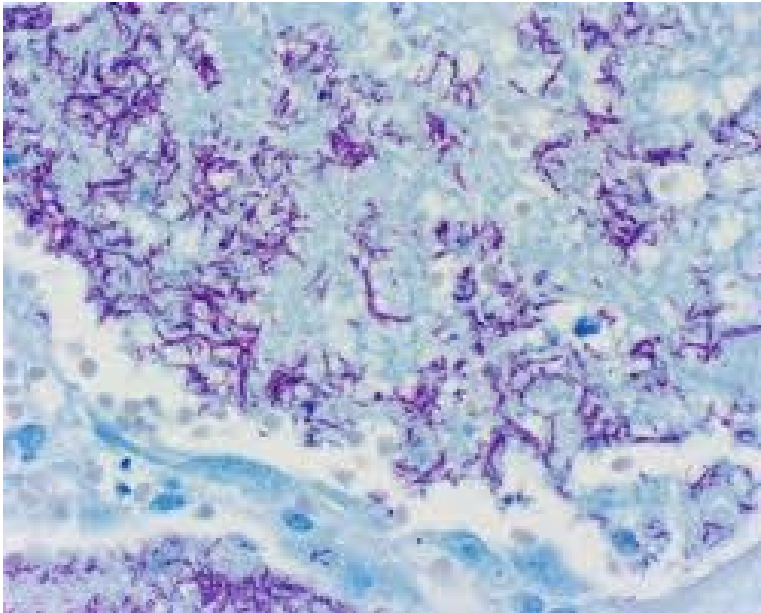
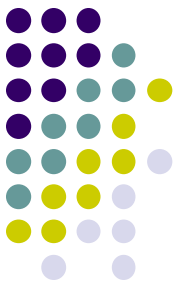
5 Rinse briefly with water to remove excess methylene blue.



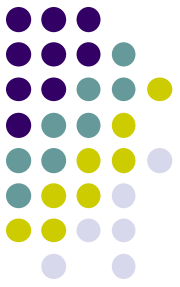
6 Blot dry with bibulous paper. Examine directly under oil immersion.

Ziehl-Neelsen acid-fast staining procedure

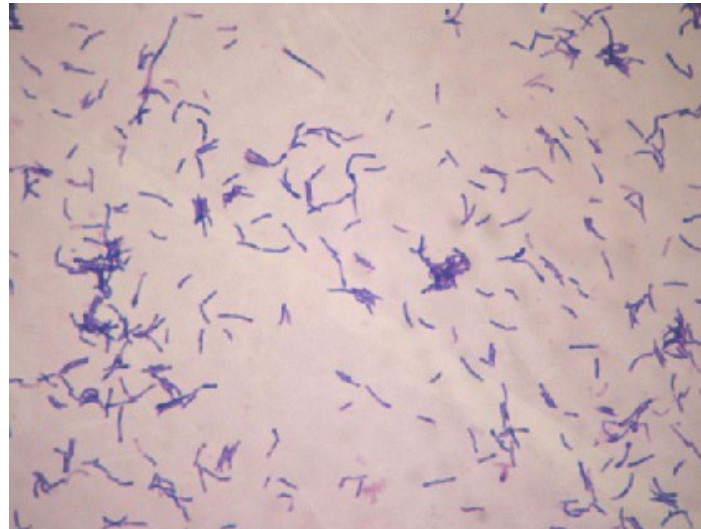
Úkol 1b: Mikroskopie mykobakteriální kultury



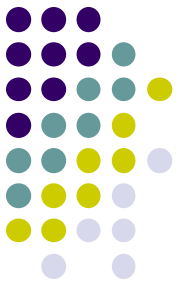
Úkol 1c – mikroskopie nokardií a aktinomycet



- V úkolu 1c popište preparáty barvené podle Grama. Uvědomte si, že částečně rezistentní aktinomycety a nokardie se dle Grama barví, i když špatně. Jsou také pleomorfní (různotvaré).



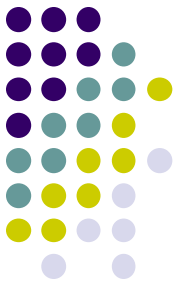
Úkol 2: kultivace mykobakterií, aktinomycet a nokardií



- Před kultivací musí být provedeno moření
- Používáme tekutou půdu Šulovu či Baničovu a vaječné půdy Ogawovu či Löwenstein-Jenssenovu.
- Dlouhá generační doba (>20 hod) - výsledky se odečítají po 3, 6 a pro jistotu i 9 týdnech kultivace.
- Aktinomycety –VLA, za anaerobních podmínek, nokardie KA



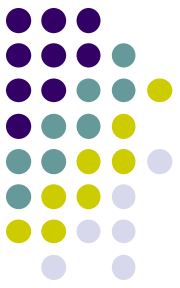
K tekuté Šulově půdě



- I pozitivní zkumavka je na první pohled čirá, protože nárůst mykobakterií je patrný jen u dna



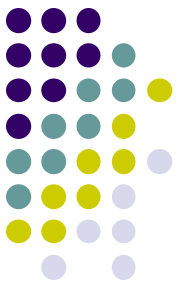
Úkol 3a: testy antituberkulotické citlivosti



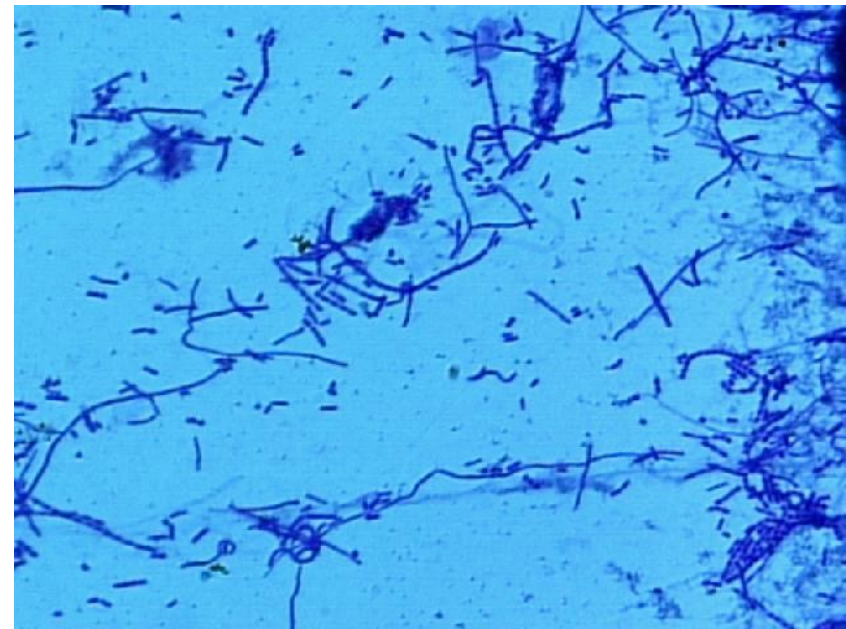
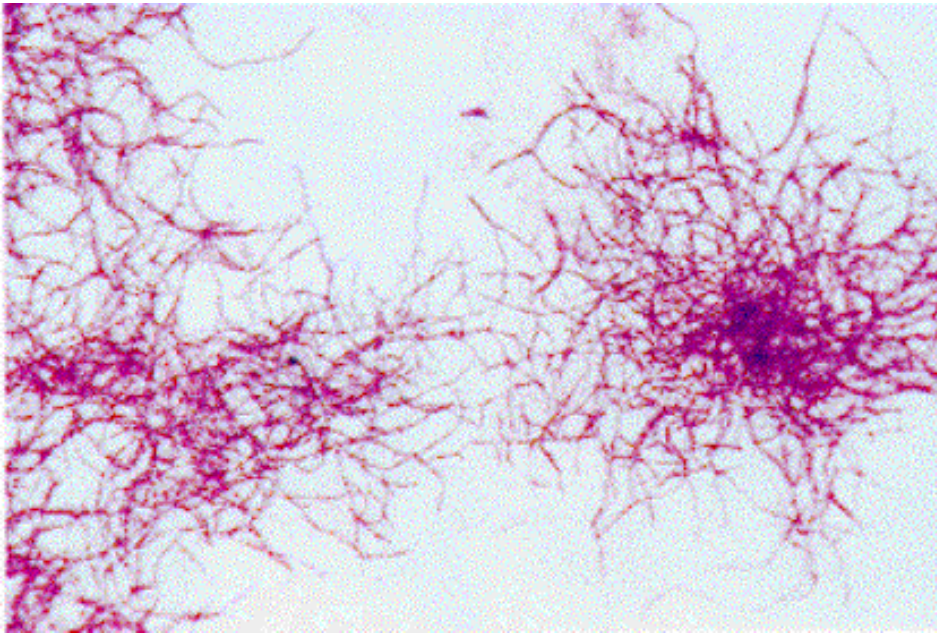
- Nelze používat difúzní diskové testy
- Antituberkulotika přidáváme přímo do kultivační půdy
- Antituberkulotika jsou zvláštní látky, až na výjimky odlišné od antibiotik
- Vždy se užívají kombinace tří či čtyř: rychle totiž vznikají rezistence, navíc některá působí jen intra- a jiná zase extracelulárně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

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

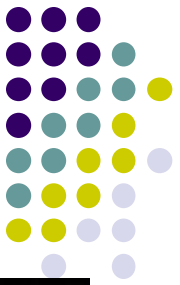
Úkol 3b: testy antibiotické citlivosti



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



Úkol 4: PCR pro diagnostiku TBC

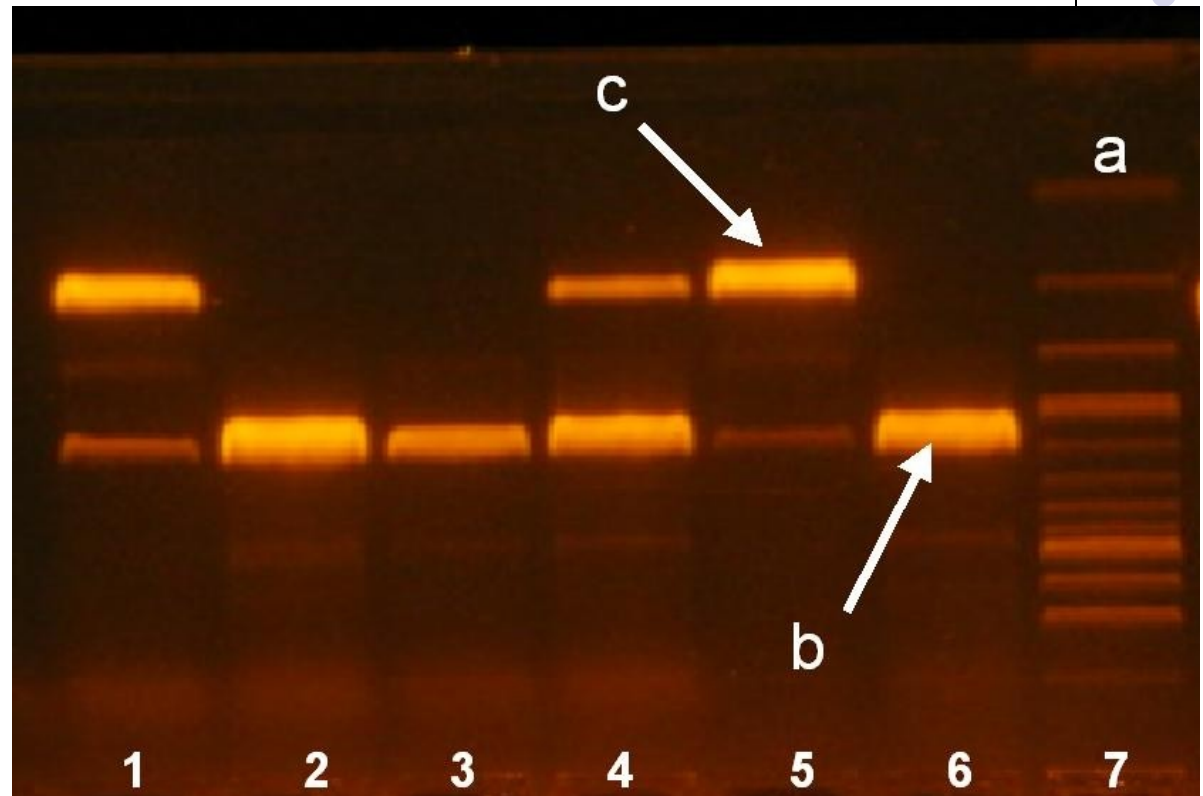


1, 2, 3, 4 = pacienti
číslo 1, 2, 4

5 = pozitivní kontrola
6 = negativní kontrola

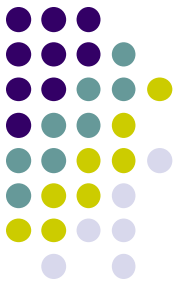
7 = ladder (žebříček)

horní řádek = proužek
vzorku (c), dolní = IC
(b)

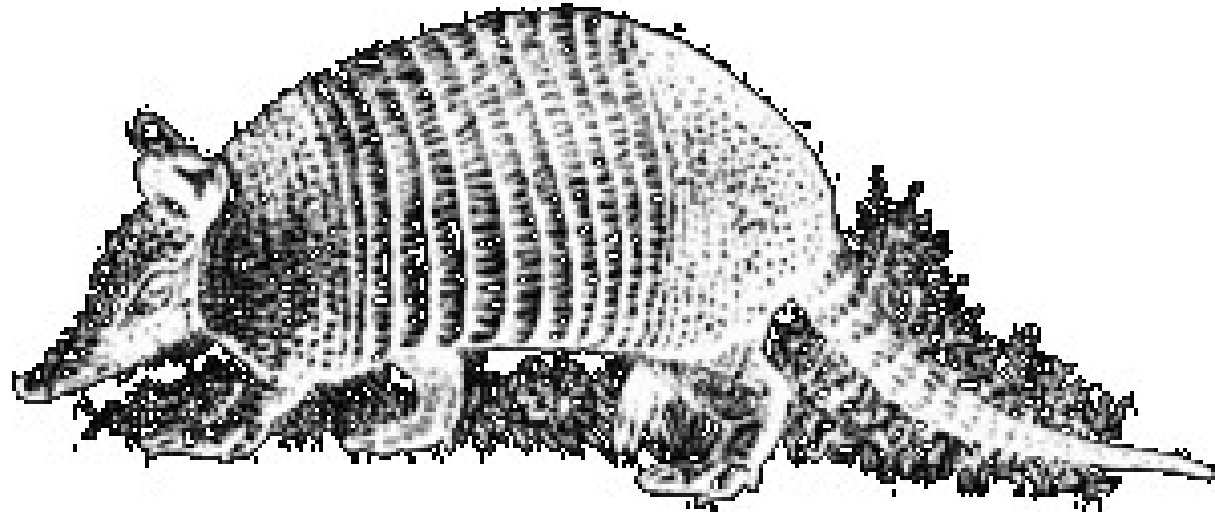


Posud'te, kteří pacienti jsou pozitivní a kteří negativní v PCR TBC. Jsou patrné nějaké případy inhibice reakce?

Úkol 5: diagnostika lepry



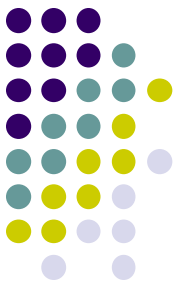
- Pásovec devítipásý
- Produkuje lepromin, který se používá k leprominovému testu- obdoba tuberkulinového testu



Test uvolnění interferonu gama (Quantiferon[©] TB-GOLD)

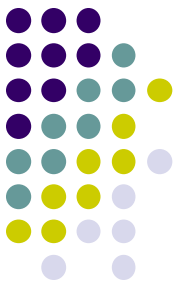


- Moderní možností k ověření buněčné imunity je vyšetření **indukovaného uvolňování interferonu gama**, v praxi se používá prakticky výhradně komerčně dostupný test Quantiferon TB-GOLD, proto budeme dále hovořit jen o něm
- Bylo prokázáno, že při tuberkulóze, a to i latentní, dochází k tomu, že **tuberkulózní 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



Quantiferon – tři zkumavky

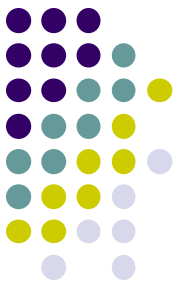
- Odebírá se nesrážlivá (heparinizovaná) krev do tří zkumavek (potřebujeme lymfocyty!)
- první zkumavka obsahuje **mitogen (MIT)** – zde by mělo za normálních okolností **vždy** dojít ke stimulaci tvorby interferonu gama
- druhá zkumavka obsahuje **antigeny TBC (TB)** – zde by mělo dojít ke stimulaci tvorby interferonu gama **pouze u infekce TBC**
- třetí zkumavka **neobsahuje nic (NIL)** – zde by za normálních okolností **nemělo docházet** ke stimulaci tvorby interferonu gama



Quantiferon – hodnocení

- Za **pozitivní** lze považovat výsledek, kdy T-lymfocyty reagují na stimulaci antigenem mykobakteria, avšak ve zkumavce neobsahující nic nedochází k tvorbě interferonu
- Za **negativní** lze považovat výsledek, kdy T-lymfocyty reagují na stimulaci mitogenem, ale nereagují na stimulaci antigenem mykobakteria
- **Neurčitý výsledek** se objeví v případě, že T-lymfocyty nejsou aktivovány ani mitogenem, nebo naopak se tvorba interferonu objeví i ve zkumavce, kde nic nebylo

Úkol 6: Interpretace výsledku testu Quantiferon TB Gold



Pomocí tabulky ve svém protokolu se pokuste interpretovat následující výsledky testu Quantiferon TB Gold examination u čtyř pacientů (máte je i v protokolu):

- **Anna:** MIT = 4,8 TB = 1,2 NIL = 1,1
- **Berta:** MIT = 5,3 TB = 4,8 NIL = 2,1
- **Cecil:** MIT = 0,9 TB = 0,9 NIL = 0,8
- **Dimos:** MIT = 8,4 TB = 8,3 NIL = 8,2

(všechny hodnoty jsou uvedeny IU/ml)

Úkol 6 – tabulka



*zjednodušeno; výsledek se také může lišit podle varianty testu

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