

Téma P08: Laboratorní diagnostika tuberkulózy a infekcí způsobených aktinomycetami, nokardiemi a spirochetami

Ke studiu: *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira* (učebnice, WWW atd.); mikroskopie, kultivace, antimikrobiální citlivost, PCR, metody průkazu protilátek

Ú 08/1: Mikroskopie acidorezistentních a vláknitých mikroorganismů

Zatímco acidorezistentní mikroorganismy (*Mycobacterium*) nelze barvit dle Grama, mikroby acidorezistentní pouze částečně (*Nocardia*) nebo vůbec (*Actinomyces*) mohou být Gramem obarveny. Nokardie a aktinomycety mají podobu grampozitivních větvených vláken, ale často vidíme i kratší tyčinky nebo dokonce koky.

a) Barvení (negativního) klinického vzorku barvicí metodou dle Ziehl-Neelsena

Ziehl-Neelsenovo barvení se používá u mykobakterií (*M. tuberculosis*, *M. leprae*), ale zejména ve „studené“ variantě dle Kinyounataké u některých parazitů (*Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*). Acidorezistentní organismy se barví pouze při zahřátí (nebo ve „studené“ variantě při použití vysoce koncentrovaného karbolfuchsinu a vysoce koncentrovaného fenolu). Zato je pak neodbarví ani kyselý alkohol (alkohol s anorganickou kyselinou). Poté je odbarvené pozadí obarveno kontrastní barvou.

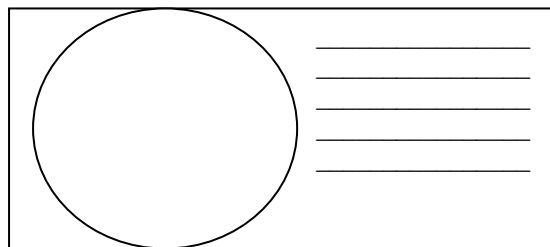
Z časových důvodů nebudete barvení provádět. Popište však alespoň barvicí proceduru – do následující tabulky запиšte názvy činidel používaných při barvení

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.

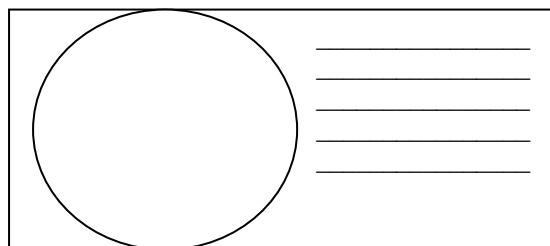
Nezapomeňte obrázek **popsat** (za použití řádků vedle obrázku).



c) Mikroskopie kmenů aktinomycet a nokardií

Prohlédněte si mikroskopicky Gramem barvené sklíčko. Popište a zakreslete pozorované objekty. Povšimněte si velkého polymorfismu organismů (od kokovitěho tvaru přes tyčinky až po vlákna, často větvená); grampozitivní, ale často až gramlabilní).

Opět obrázek i **popište**.



Úkol 08/2: Kultivace mykobakterií, aktinomycet a nokardií

Kultivační nároky acidorezistentních a částečně acidorezistentních bakterií jsou velmi různorodé.

- ❖ Pro *Mycobacterium tuberculosis* používáme tekuté (Šula) 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 mikroaerofilní s tím, že jejich potřeba kyslíku je tak nízká, že jim vyhovuje anaerobní prostředí.

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	
	anaerobní WCHA agar	
<i>Nocardia</i>	krevní agar	
	anaerobní WCHA agar	

Úkol 08/3: 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*

Z časových důvodů se neprovádí. Odečítalo by se jako běžné difusní diskové testy u jakékoli jiné bakterie.

Úkol 08/4: PCR v diagnostice TBC

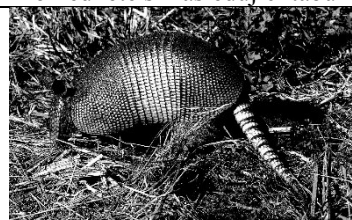
Jelikož je kultivace mykobakterií obtížná, stává se PCR velmi důležitou diagnostickou metodou.

Odečtete výsledek PCR TBC (z prezentace), запиšte a interpretujte výsledky

Pacient č.	Proužek vzorku	Interní kontrola	Interpretace
1			
2			
3			
4			

Úkol 08/5: Diagnostika lepry

Lepra je nemoc, která stále postihuje miliony lidí v méně rozvinutých zemích. Její diagnostika je obtížná. Prohlédněte si následující tabulku.

	Toto zvíře se jmenuje	pásovec devítipásý
	Používá se k výrobě	leprominu
	a tato látka se používá při	leprominovém testu v diagnostice lepry

By Hans Stieglitz - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=11037077>. Adapted.

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 nespecificky 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.

Interpretujte 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		

Poznámka: Vylepšená verze testu QUANTIFERON zahrnuje čtyři (a ne tři) zkumavky, jelikož „TB“ je nahrazeno dvěma typy antigenů. Nicméně pro zjednodušení zde počítáme s klasickou variantou testu.

Lymeská borrelióza

Společná tabulka pro úkoly 09/1, 2 a 3

Písmeno pacienta	Krátký klinický popis (1–3 slova charakterizující situaci)	ELISA (Úkol 09/1)				W. blot (Ú09/2)		PCR (Ú09/3) (+/-)	Závěr: konečná interpretace, dopor. případné léčby
		IgM		IgG		IgM (+/-)	IgG (+/-)		
		Abs.	(+/-)	Abs.	(+/-)				
J									
K									
L									
M									
N									

Úkol 09/1: Průkaz protilátek proti *Borrelia garinii* metodou ELISA

Odečtete podle výkladu vyučujícího výsledek reakce u pacientů s podezřením na lymeskou borreliózu. Určujeme protilátky ve třídě IgG a IgM. V poli A1 (odpovídá důlku A1 v mikrotitrační destičce) naleznete hodnotu CAL (hraniční hodnotu; všechny hodnoty absorbance nad CAL jsou pozitivní, vše pod CAL budiž negativní). V polích B1 a C1 jsou kontroly. Pacienti označení písmeny J až N jsou v barevně označených polích. Zapište hodnotu CAL, zkontrolujte, jestli negativní a pozitivní kontrola je v pořádku. Pak odečtete a vyhodnoťte výsledky ELISA reakce pro pacienty No. J, K, L, M, N (ty nepište sem, použijte hlavní tabulku nahoře).

Hodnota CAL (důlek A1):		Hodnota absorbance K+ (důlek B1):		<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	← zaškrtněte, co platí
IgM		Hodnota absorbance K- (důlek C1):		<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	
Hodnota CAL (důlek A1):		Hodnota absorbance K+ (důlek B1):		<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	← zaškrtněte, co platí
IgG		Hodnota absorbance K- (důlek C1):		<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	

Úkol 09/2: Průkaz protilátek proti *Borrelia garinii* pomocí Western blotu

U pacientů řešených v úkolu č. 1 se vzorky séra či likvoru testovaly také Western blotem. Odečtete výsledky dle instrukcí. Pro odečtení reakce použijte kontrolní proužek. Diagnostické schéma je vždy stejné: ELISA je použita ke screeningu, Western blot ke konfirmaci jejich výsledků. Odečtete Western blot u pacientů J až N a zapište výsledky do hlavní tabulky.

Úkol 09/3: Diagnostika Lymeské borreliózy pomocí PCR

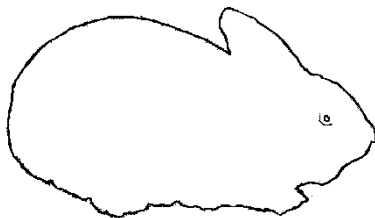
Pomocí dané fotografie PCR produktu na agarózovém gelu zakreslete a zaznamenejte který z testovaných vzorků je pozitivní. Poté proveďte celkové zhodnocení všech tří úkolů a zapište závěr.

Syfilis

Původce syfilis, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, NENÍ in vitro kultivovatelný organismus. Diagnostika závisí na stádiu nemoci.

Úkol 09/4: Přímý průkaz syfilis.

Přímý průkaz syfilis je možný pouze v případě zaslání vhodných vzorků do laboratoře. V některých stádiích nemoci však není k mání žádný vhodný vzorek pro tento účel.



a) Rabbit infectivity test – RIT

Zapište název králíka používaného pro tento test.

(Je odvozen z tohoto souostrovní: →→→→→→→→→→.)

Exudát z podezřelého vředu je zpravidla vyhodnocován zástinovou mikroskopií a očkovan do králičích varlat. Testované zvíře začíná trpět orchitidou 10 dní po naočkování. Název králíka:



b) Mikroskopie v zástině

Podívejte se na mikrofotografii treponemat ze zástinové mikroskopie. Pro urychlení máte tento úkol již vyplněn.

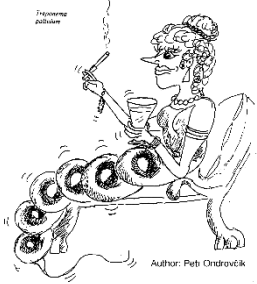
c) Přímá imunofluorescence

Pro urychlení máte i tento úkol už vyplněn.



Nepřímý průkaz syfilis

Společná tabulka pro úkoly 09/5 a 09/6.

Písmeno pacienta		Úkol 09/5 screening		Úkol 09/6 konfirmasiace				Závěr: konečná interpretace, doporučení případné léčby		
		RRR	TPHA	FTA-ABS		ELISA			WB	
				Absor- bance	IgM (+/-)	Absor- bance	IgG (+/-)		IgM (+/-)	IgG (+/-)
A										
B										
C										
D										
E										

Úkol 09/5: Screening syfilis – RRR a TPHA

Těhotné ženy a dárce krve jsou screeningově vyšetřováni rychlou reaginovou reakcí (RRR) a *Treponema pallidum* pasivní hemaglutinací (TPHA). Posuďte výsledky screeningu u předložené skupiny osob a stanovte, u koho je třeba ještě zajistit podrobnější, tzv. konfirmační (potvrzovací) vyšetření. Výsledky запиšte přímo do tabulky.

RRR: pozitivní je vyvločkování. TPHA: pozitivní je tvorba aglutinátu.

Úkol 09/6: Konfirmace syfilis – FTA-ABS, ELISA a Western blotting

Vyhodnoťte výsledky FTA-ABS, ELISA a western blottingu (WB – vizte výklad v protokolu P07a) u pacientů se suspektní syfilis (viz předchozí úkol). Spočítejte cut-off a porovnejte s ním hodnoty pozitivní a negativní kontroly a výsledky pacientů.

V poli/důlku A1 je přítomen blank.

Hodnota cutoff (C1 + D1) / 2		Hodnota absorbance K- (pole/důlek B1):	<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	← zaškrtněte, co platí
IgM		Hodnota absorbance K+ (pole/důlek E1):	<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	
Hodnota cutoff (C1 + D1) / 2		Hodnota absorbance K- (pole/důlek B1):	<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	← zaškrtněte, co platí
IgG		Hodnota absorbance K+ (pole/důlek E1):	<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	

Leptospiróza

Úkol 09/7: Přímý průkaz *Leptospiras*.

Prohlédněte si morfologii leptospir kultivovaných na tekutém Korthoffově médiu po dva týdny. Pro test byla použita moč pacienta s podezřením na leptospirózu. Pro urychlení

