

P08

**Laboratorní diagnostika
tuberkulózy, aktinomycet
a nokardií**

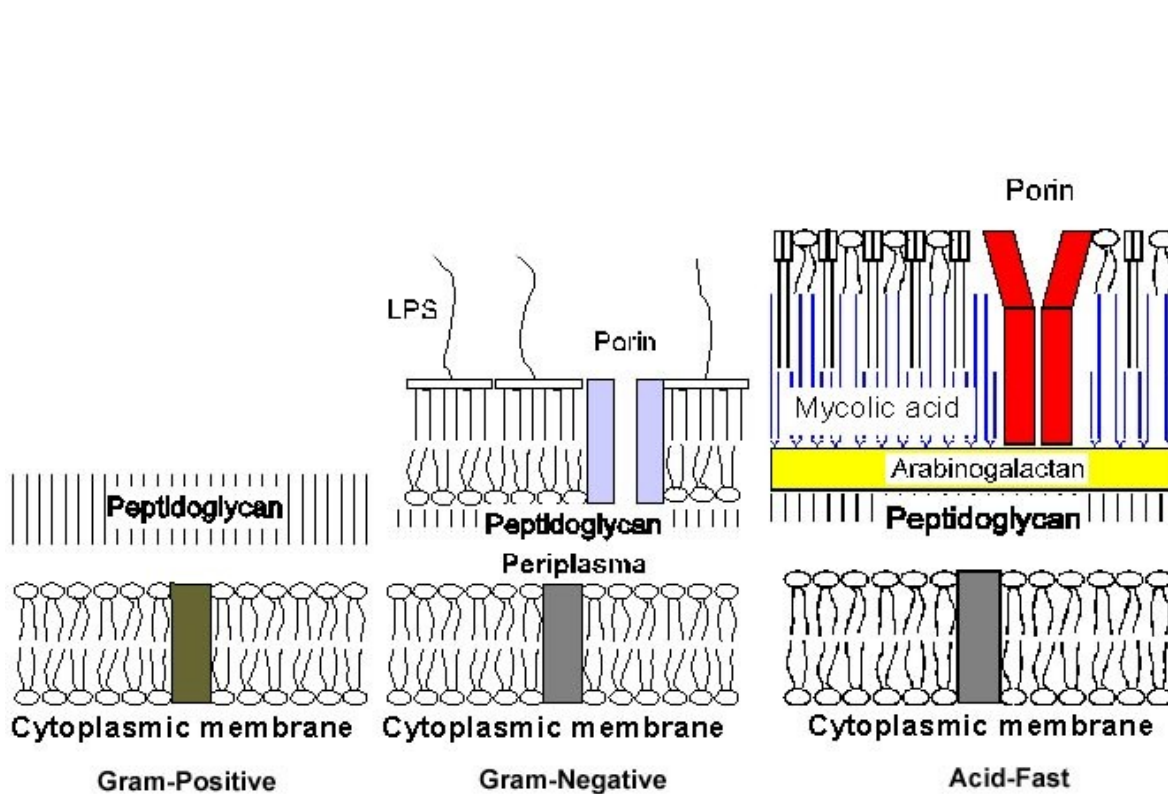
Osnova

- acidorezistence
- rod *Mycobacterium* (TBC, lepra, mykobakteriózy)
- *Actinomyces spp.*, *Nocardia spp.*
- úkoly

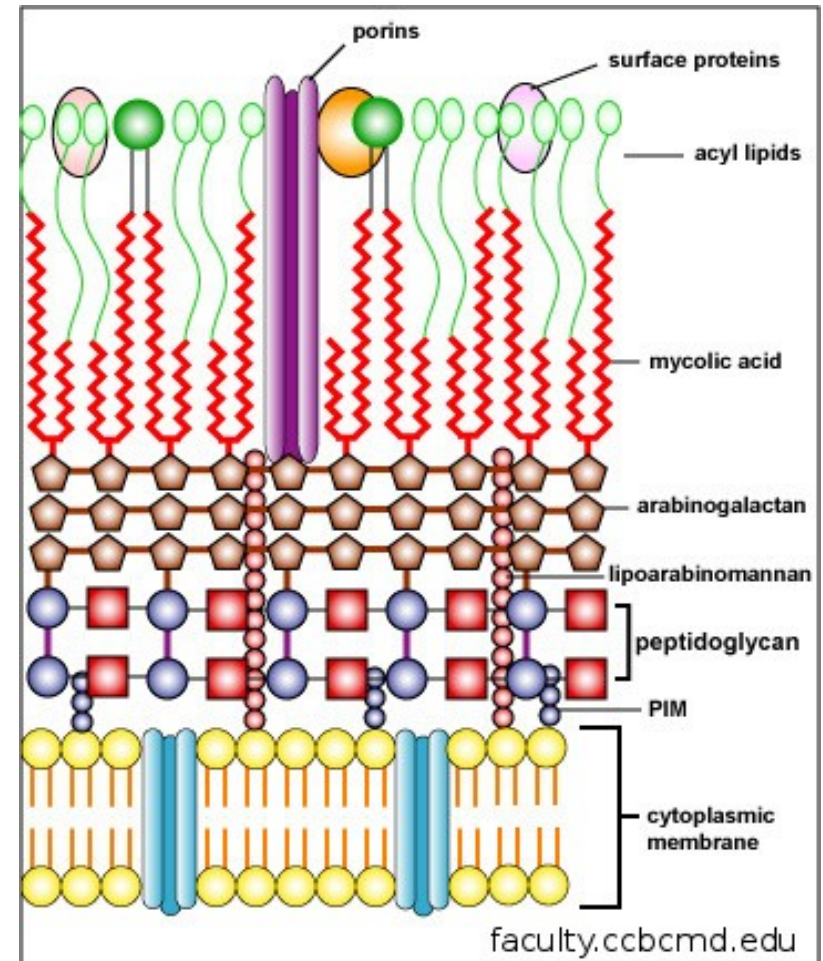
Acidorezistence

- **vysoký obsah lipidů** v buněčné stěně
 - vysoce hydrofobní
 - tvoří fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteiny
 - mykolové kyseliny
- **obtížná barvitelnost** (hydrofilními) organickými barvivy (nebarví se Gramovým barvením)
- **odolnost ke kyselinám** (využití při Ziehl-Neelsenově barvení), **zásadám** (využití při kultivaci) i alkoholům
- typická pro **mykobakterie**
- částečně pozorováno u aktinomycet a nokardií

Acidorezistence (2)



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



Rod *Mycobacterium*

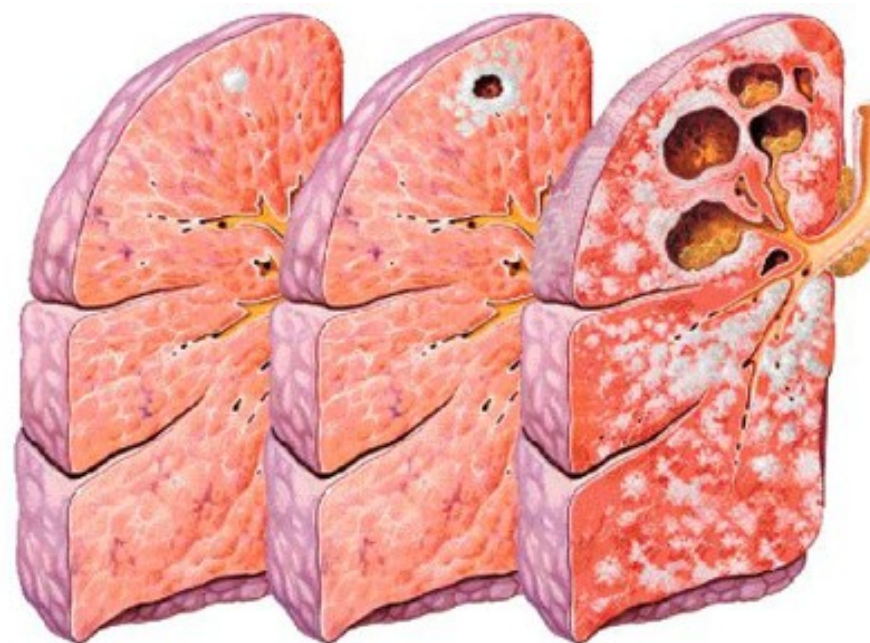
- G+ nepohyblivé, nesporující, **aerobní**
- **dlouhá generační doba** → kultivace až v řádu týdnů
- **acidorezistence**, alkalirezistence
- **přežívání uvnitř makrofágů** (hlavní roli má buněčná imunita → minimum protilátek)
- **odolné** k vyschnutí a dezinfekčním látkám (nestačí spektrum A; T = TBC, M = atypické mykobakterie)
- *M. tuberculosis* – TBC
- *M. leprae* – lepra (malomocenství)
- *M. bovis*; *M. bovis* BCG (očkovací kmen)
- atypické mykobakterie

Tuberkulóza (TBC)

- ***Mycobacterium tuberculosis*** (bacil Kochův, BK),
vzácně *M. bovis*
- obvykle vstup přes **plíce** (vzácně přes GIT nebo ránou)
- vznik **primárního komplexu** (zánětlivé ložisko v plicním parenchymu, zánět a zvětšení příslušné regionální mízní uzliny) → **buněčná imunita** → hojení fibrotizací nebo kalcifikací
 - spontánní celkové zhojení
 - ložiska infekce (**granulomy neboli tuberkly**) kaseifikují (latentní forma) → jádro se rozpadne a zkapalní → infekční obsah se uvolňuje to bronchů → vykašlávání (otevřená TBC)
 - šíření krví (inf. kteréhokoli orgánu) - miliární TBC

Postprimární TBC

- za několik týdnů až mnoho let po primární infekci (**reaktivace primární infekce**, někdy superinfekce)
- reaktivace po opakované infekci mykobakteriemi, progresi primární infekce např. po těžké respirační infekci, u oslabených jedinců (stáří, alkoholici, imunokompromitovaní)
- **otevřená TBC**
 - kašel, hemoptýza (chrchlání krve), zvýšená teplota, hubutí
 - někdy bezpříznaků



infekce v horním plicním laloku

tvorba tuberklu

progrese TBC

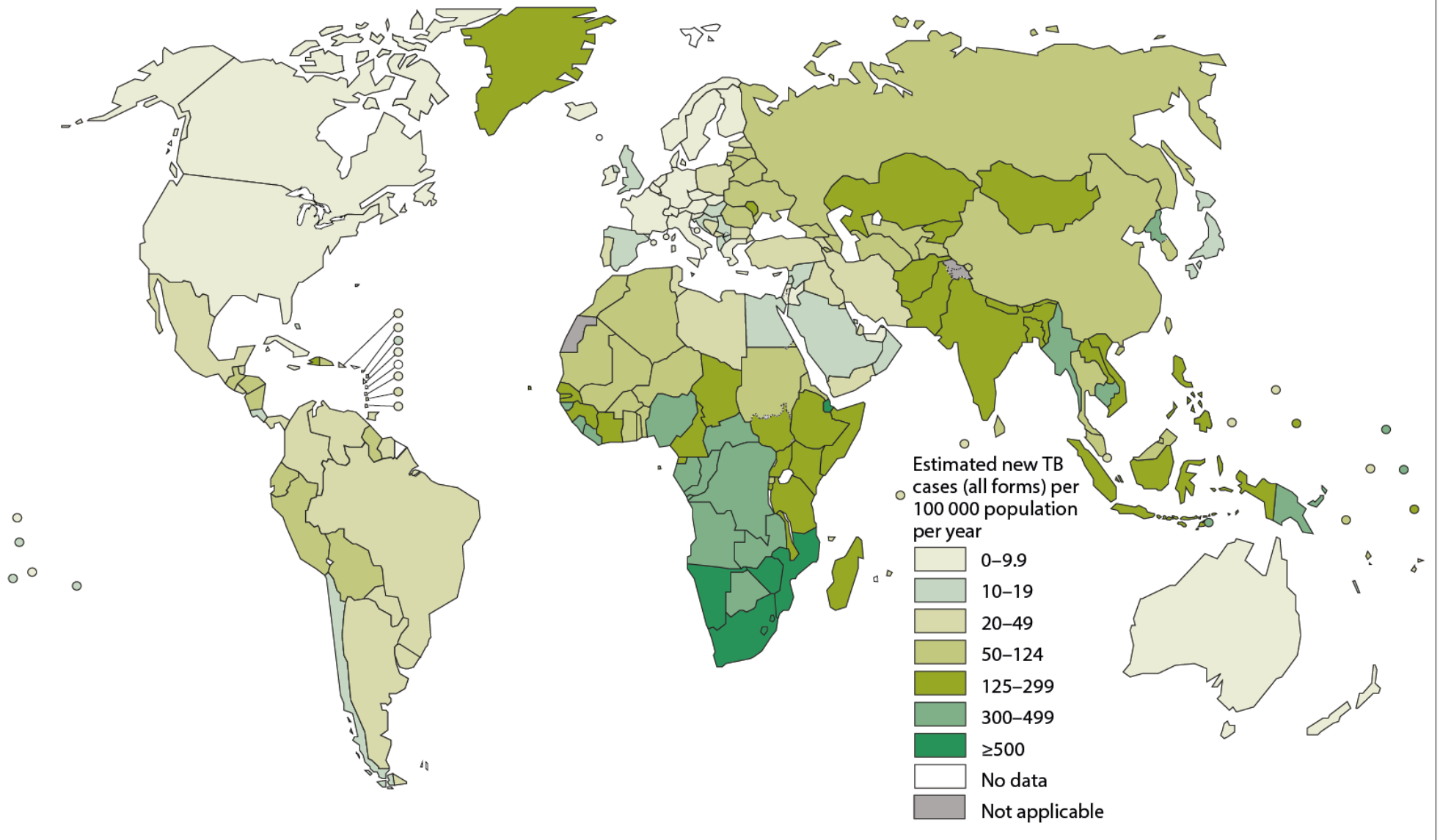
Léčba TBC

- **vždy kombinace antituberkulotik** (vznik rezistence)
- 1. řada: **izoniazid, rifampicin, pyrazinamid, etambutol, streptomycin**
- 2. řada: amikacin, kanamycin, capreomycin, ofloxacin, ciprofloxacin, cykloserin, rifabutin, ...
- **MDR** (multidrug-resistant): izoniazid a rifampicin
- **XDR** (extensively drug-resistant): izoniazid, rifampicin, fluorochinolony, amikacin/kanamycin/capreomycin
- léčba 4 až 12 měsíců:
 - iniciální: **čtyřkombinací** po 2 měsíce (snížení množ.)
 - pokračovací: dvojkombinací (sterilizace ložiska)

Očkování proti TBC

- **donedávna povinné očkování** novorozenců živou vakcínou **BCG** (**kalmetizace**, *bacille Calmette-Guérin*)
 - připraveno z kmene *M. bovis* pasážováním
- donedávna povinné přeočkování při negativním výsledku kožního tuberkulinového testu
- 2010 – plošné očkování zrušeno → **selektivní očkování**
 - **povinně očkování jen ohrožení novorozenci** (např. předchozí výskyt v rodině, rodiče udávají delší pobyt v zemích se zvýšenou incidencí TBC)
 - ve vzácných případech defektu imunity docházelo po kalmetizaci ke generalizované infekci očkovacím kmenem

Estimated TB incidence rates, 2013



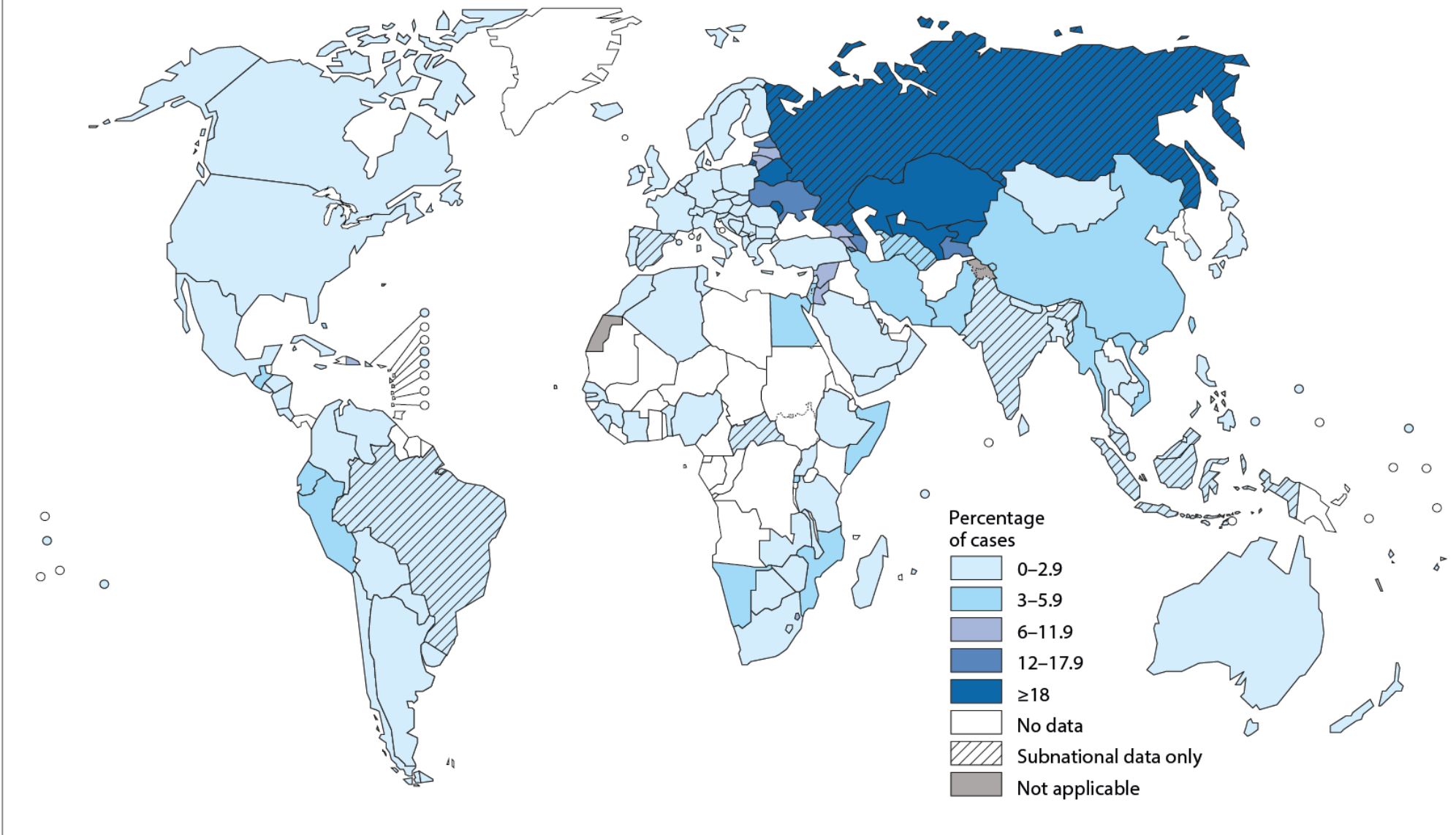
The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers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



Percentage of new TB cases with MDR-TB



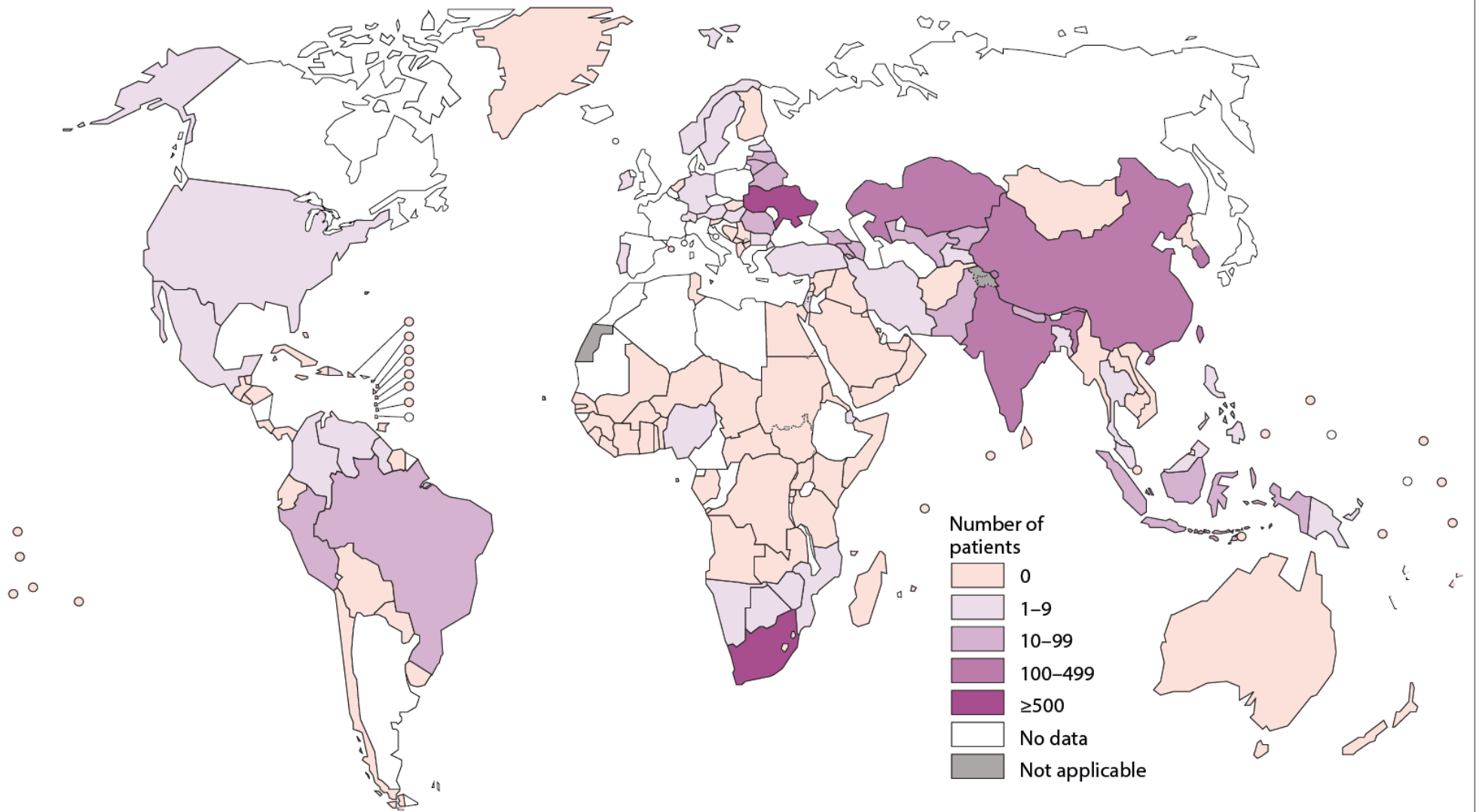
The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers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

- ***Mycobacterium leprae*** (Hansenův bacil)
- **extrémně dlouhá generační doba** (cca 2 týdny), inkubační doba několik let
- růst při nižší teplotě (30 °C) → okrajové části těla
- často bez příznaků, málo nakažlivá (kromě kožní formy s vředy)
- může se vyvinout destruktivní forma (napadá Schwannovy bb. a makrofágy v PNS, ničí imunitní bb.)
- neexistuje vakcína, ale ochranný účinek má očkování proti tuberkulóze
- léčba: dapson + rifampicin + clofazimin (měsíce až léta)

Lepra (projevy)



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** (dle Kinyouna)
- **kultivace: speciální vaječné půdy** (moření louhem kvůli usmrcení ostatních bakterií)
- **automatická kultivace:** kultivace v automatech, které detekují pozitivitu dříve
- biochemické rozlišení: pouze specializované laboratoře
- pokus na zvířeti: morče (na ústupu)
- **PCR diagnostika:** nabývá na důležitosti

Nepřímý průkaz TBC

- **tvorba protilátek 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 γ** (reakce pacientových buněk na antigen) – test QuantiFERON-TB

QuantiFERON-TB

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

QuantiFERON-TB - 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

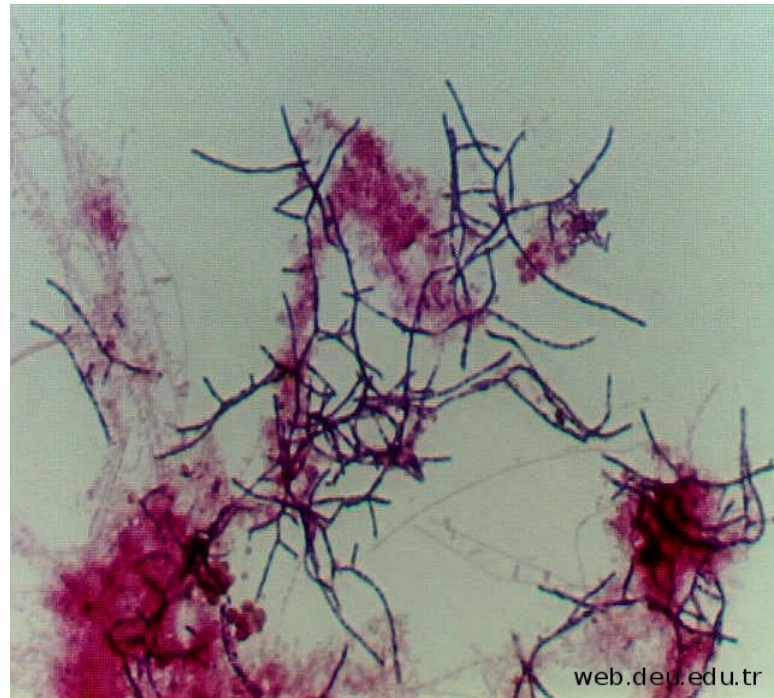
Actinomyces spp.

- **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.

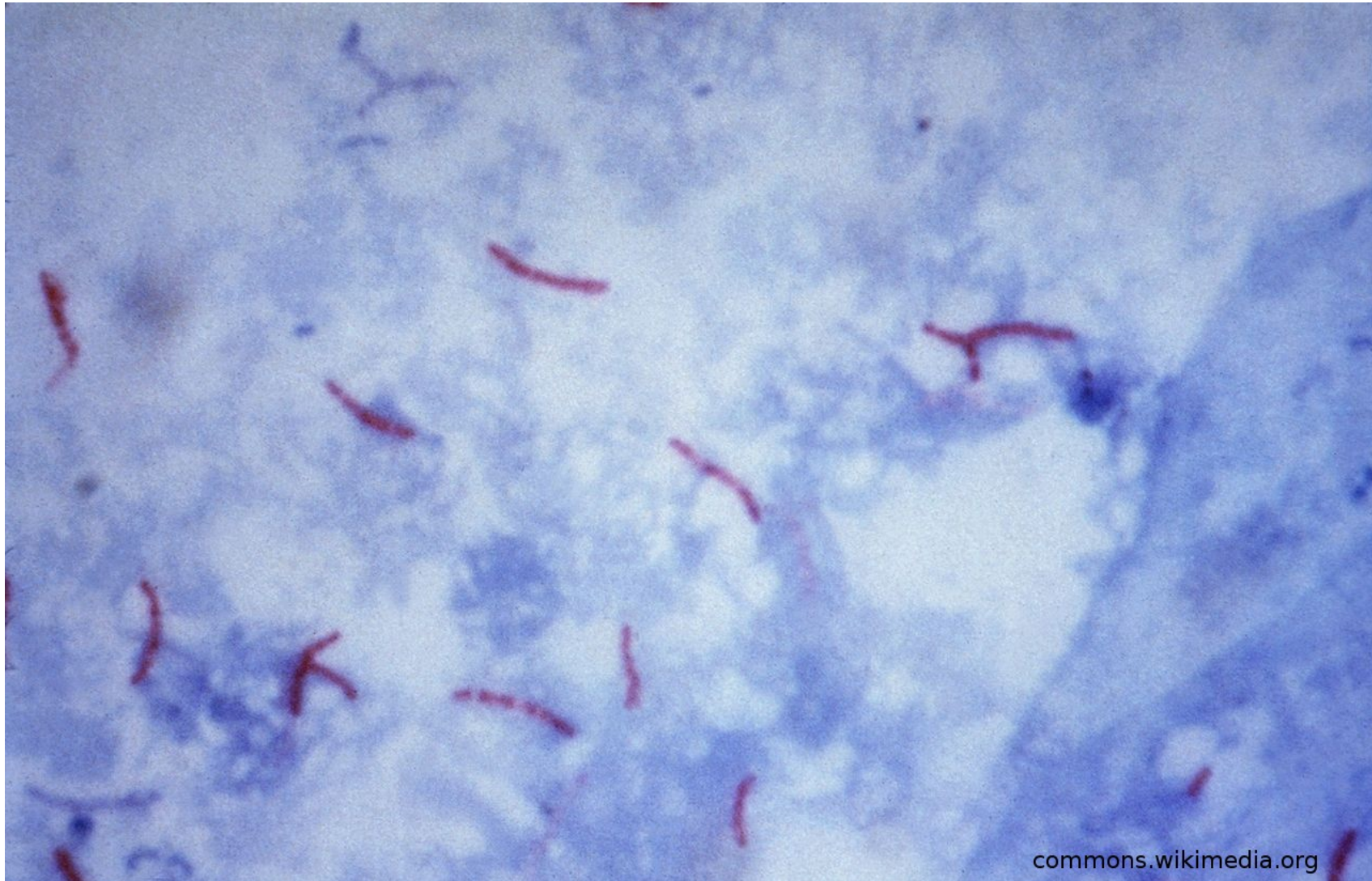
- G+ **aerobní tyčky až vlákna**, částečně acidorezistentní
- půdní bakterie (subtropy, tropy) → exogenní nákazy
- **chronické kožní abscesy**
- *N. asteroides* - **plicní infekce** (možná diseminace, mozkové abscesy)
- *N. brasiliensis*
(podkožní abscesy)



Úkol 1a+b: Barvení dle Ziehl-Neelsena, mikroskopie

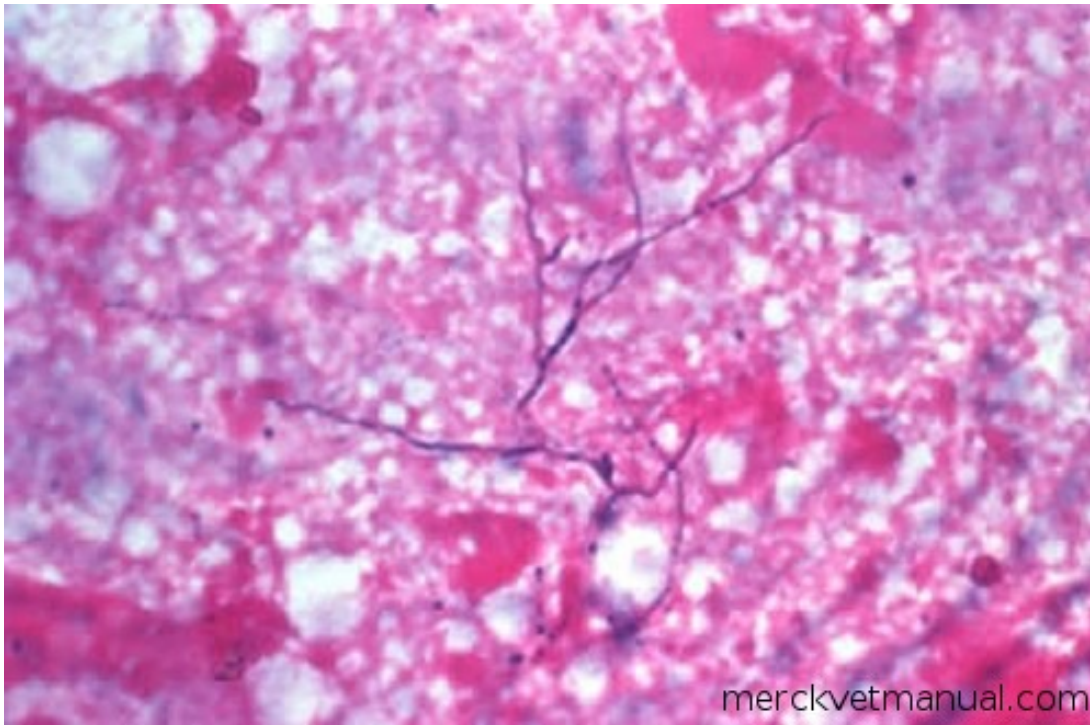
- barvení dle Ziehl-Neelsena
 - **barvíme karbolfuchsinem** (Gabbet) za horka až do výstupu par (**po odpaření části barviva ho doplníme** a opět zahříváme, opakujeme celkem 3x)
 - zahřívání provádíme v dostatečné vzdálenosti, aby v průběhu neprasklo podložní sklíčko)
 - **odbarvujeme** cca 15 sekund **kyselým alkoholem** (směs ethanolu s HCl nebo H₂SO₄), **opláchneme vodou**
 - dobarvujeme pozadí **malachitovou zelení** nebo **metylénovou modří** cca 30 sekund
 - barvení lze použít i pro střevní kokcidie (kryptosporidia a cyklospory)

Úkol 1a+b: Barvení dle Ziehl-Neelsena, mikroskopie (2)

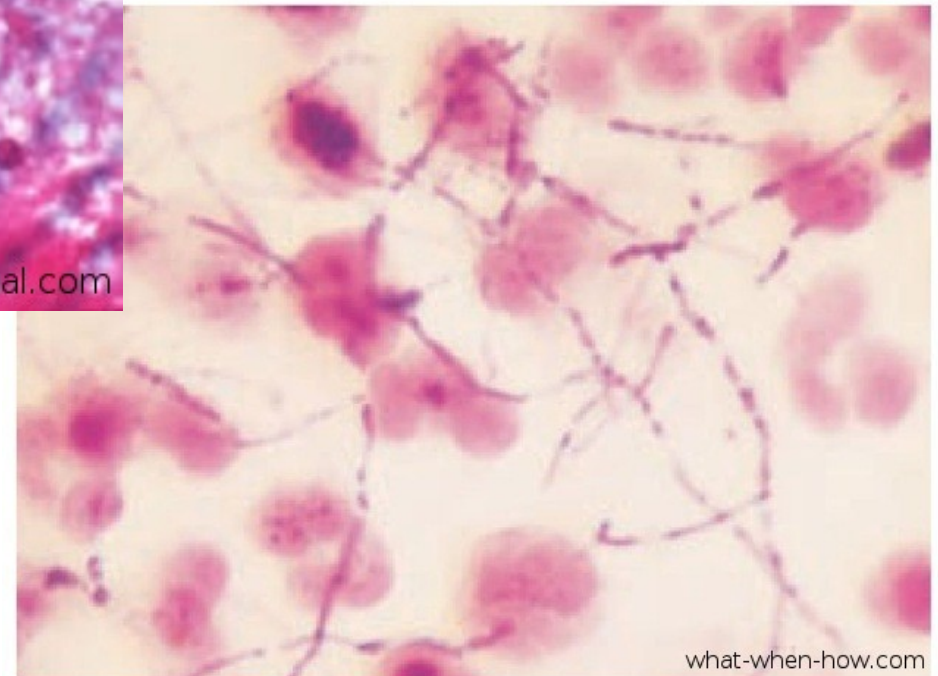


commons.wikimedia.org

Úkol 1c: Mikroskopie kmenů aktinomycet a nokardií (Gram)



aktinomycety – větvení ve variabilní úhlu



nokardie – časté větvení v pravém úhlu

Úkol 2: Kultivace mykobakterií, aktinomycet a nokardií

- ***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

Úkol 2: Kultivace mykobakterií, aktinomycet a nokardií (2)



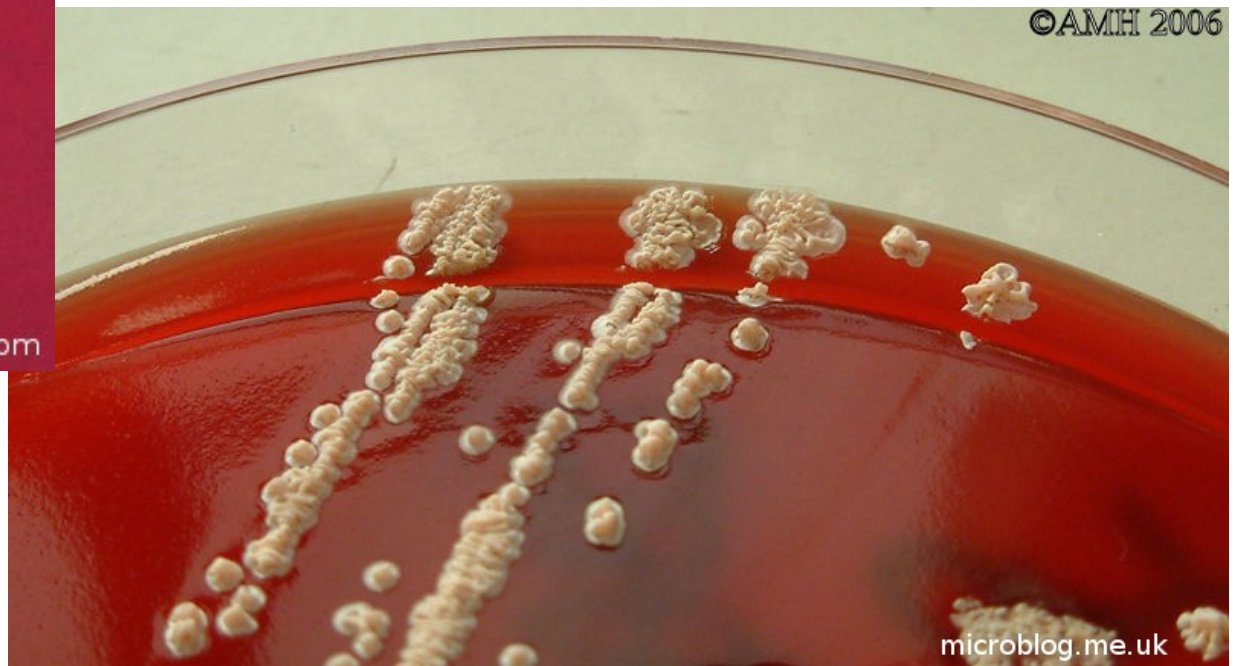
růst na pevné půdě

Úkol 2: Kultivace mykobakterií, aktinomycet a nokardií (3)



aktinomycety - nepravidelné kolonie s lalůčky a výběžky

nokardie - nepravidelné kolonie, suchý vzhled

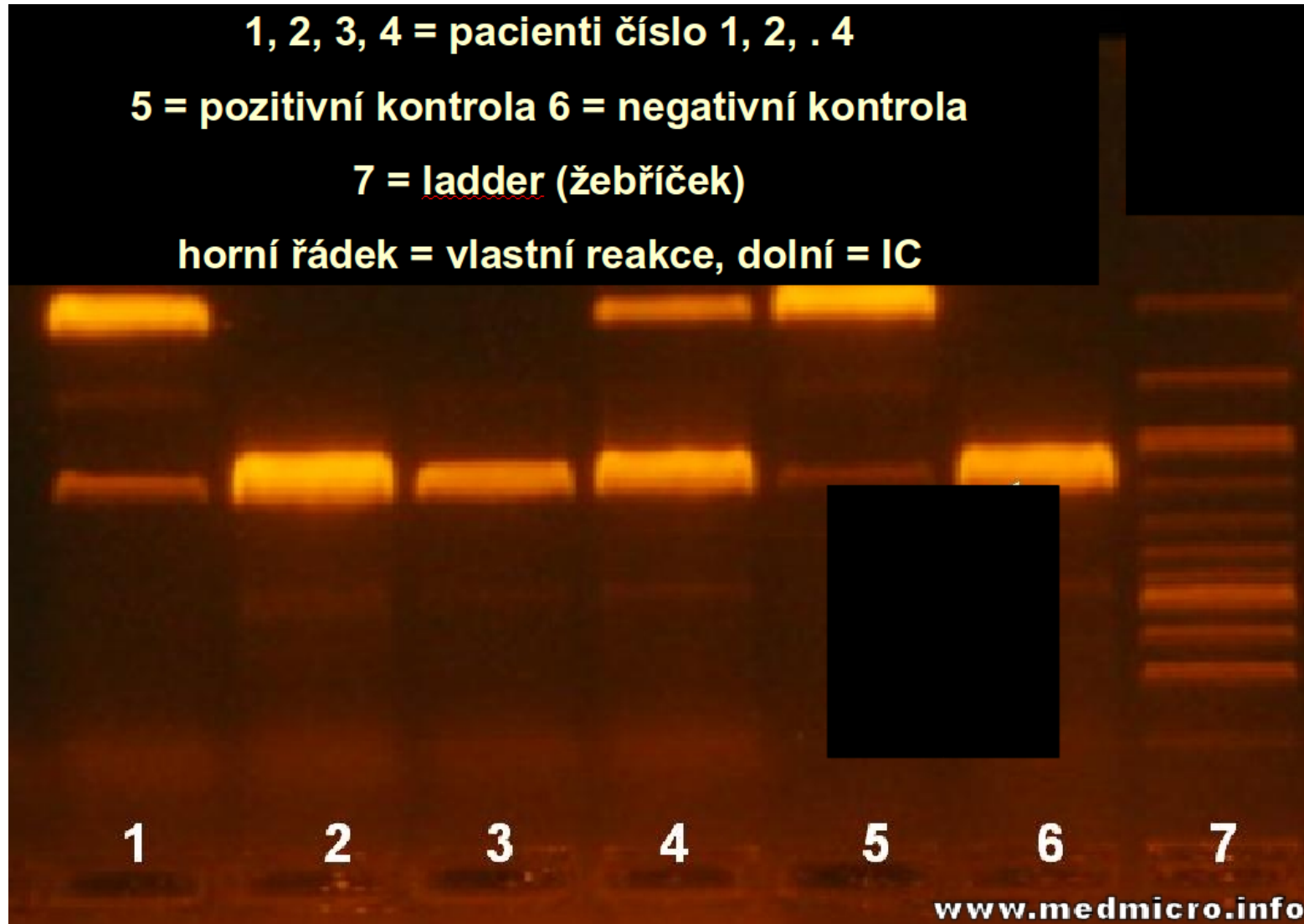


Úkol 3a+b: Určení citlivosti na antimikrobiální látky

- **kombinace** tří čtyř **antituberkulotik** (rychlý vznik rezistencí, některá působí jen intracelulárně nebo extracelulárně)
- nelze používat difúzní diskové testy
- antituberkulotika přidáváme přímo do (pevné) kultivační půdy + zařadíme kontrolu růstu
- **mykobakterium roste: rezistentní**
- **mykobakterium neroste: citlivé**

- odečtete difúzní diskový test pro kmeny *Nocardia* a *Actinomyces*

Úkol 4: PCR v diagnostice TBC



Úkol 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 TBC)



Úkol 6: Nepřímý průkaz TBC pomocí QUANTIFERON®-TB Gold

- pokuste se interpretovat výsledky testů u pacientů (hodnoty uvedeny v IU/ml)

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	Nepravděpodobná
	$\geq 0,35$	jakákoli hodnota	pozitivní	Pravděpodobná
	$< 0,35$	$< 0,5$	nejistá	Nelze určit
$> 8,0$	jakákoli hodnota	jakákoli hodnota		Nelze určit

Po tomto cvičení byste měli umět:

- vysvětlit co je to acidorezistence a jak se projevuje
- popsat zástupce acidorezistentních bakterií vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- zhodnotit význam přímých a nepřímých metod v diagnostice acidorezistentních bakterií vč. vhodnosti jejich použití pro konkrétní případy