

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

Mykobakteriomy

- **Oportunní (podmíněné) patogeny**
 - Pomalu rostoucí
 - **M. kansasii** – endemicky v oblasti s důlním a hutním průmyslem – chron. plicní onemocnění
 - **M. marinum** – vodní rezervoáry - kožní granulomy (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**

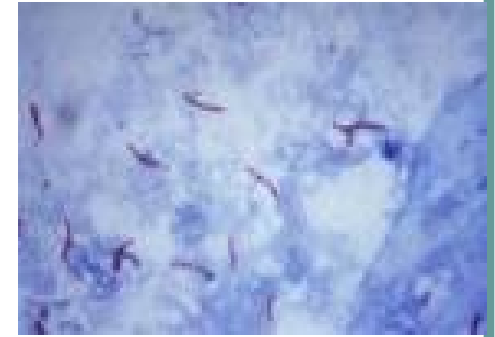
- Karbolfuchsin za horka
- Kyselý alkohol (s HCL)
- Dobarvení methylenovou modří nebo malachitovou zelení
- červené tyčinky

- **Fluorescenční barvení**

- auraminem O

- materiál

- z kultivační
půdy



Pomalý růst na speciálních půdách

- **Pomalou 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

Mykobakteriomy

- Granulomatomy zanyetlivy onemocneny, postihujy pprevayzney plice
- Prens cestou inhalyy, kontaktem
- Predisponujy faktory: TBC, plicny fibrzy, cysticky fibrzy, bronchiektazy, silikzy, CHOPN, HIV, geneticky podmnyeny vnmyavost
- Prysnyky: expektorace, purulentny sputum, hemoptyyza, hubnuty, febrilie, poceny, unava
- ***M. avium, M. kansasii, M. xenopi, M. fortuitum***
- rezistence na rady antituberkulotiky

Rozdělení mykobakterií

- Rychlost růstu
 - Pomalu rostoucí (3 – 6 – 9 týdnů)
 - Rychle rostoucí (2 – 7 dnů)
- Barva kolonií
 - Nonchromogení
 - Fotochromogení
 - Skotochromogení

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 mykobakteriόza
 - Vlhké tropické oblasti
 - Manifestace: nodulární útvar měnící se v rozsáhlé kožní léze



Pomalou rostoucí (3 – 6 týdnů)

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



Pomalou rostoucí (3 – 6 týdnů)

- **Skotochromogenní**
(rostou v barevných koloniích i potmě)
 - **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

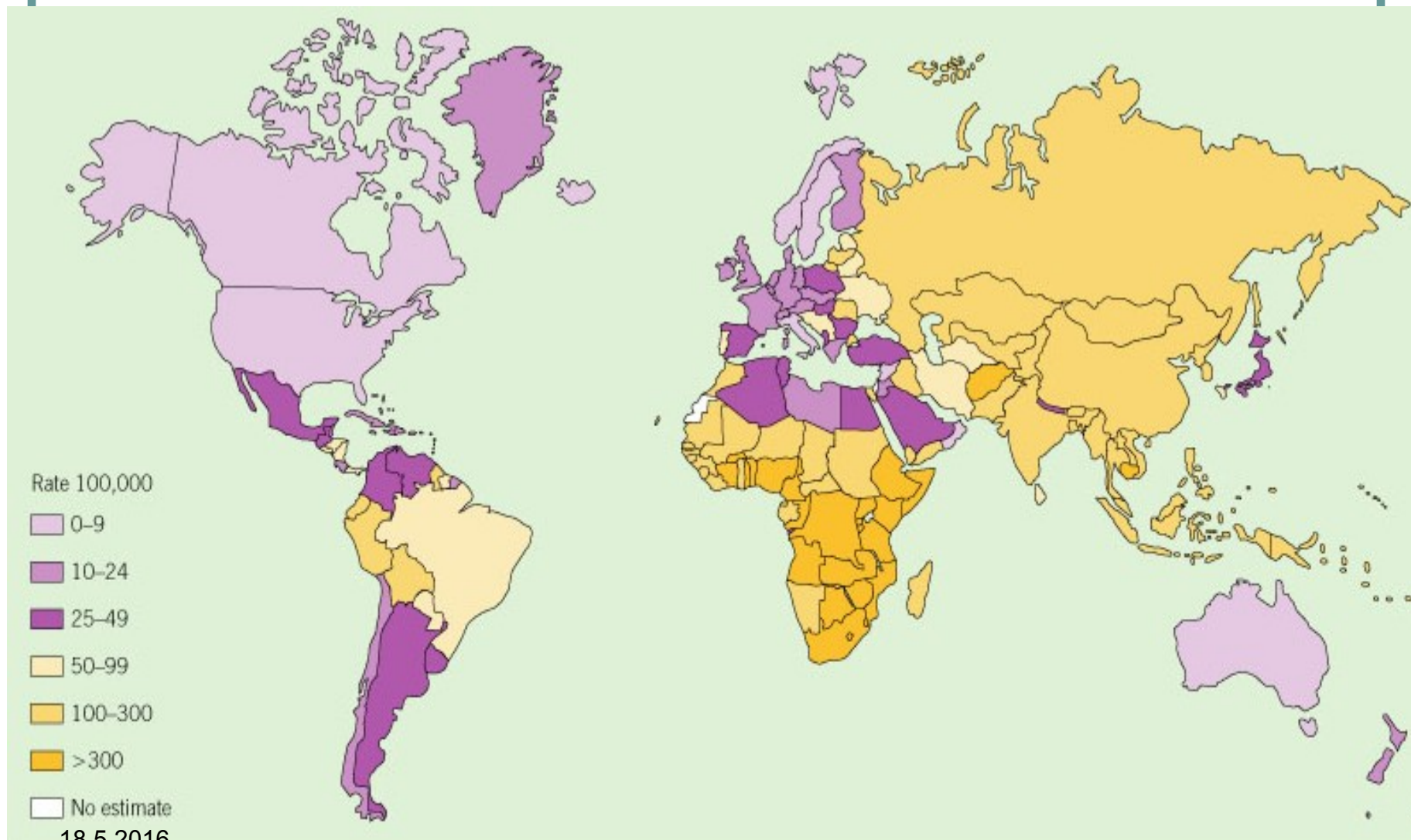


Mycobacterium tuberculosis

- 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

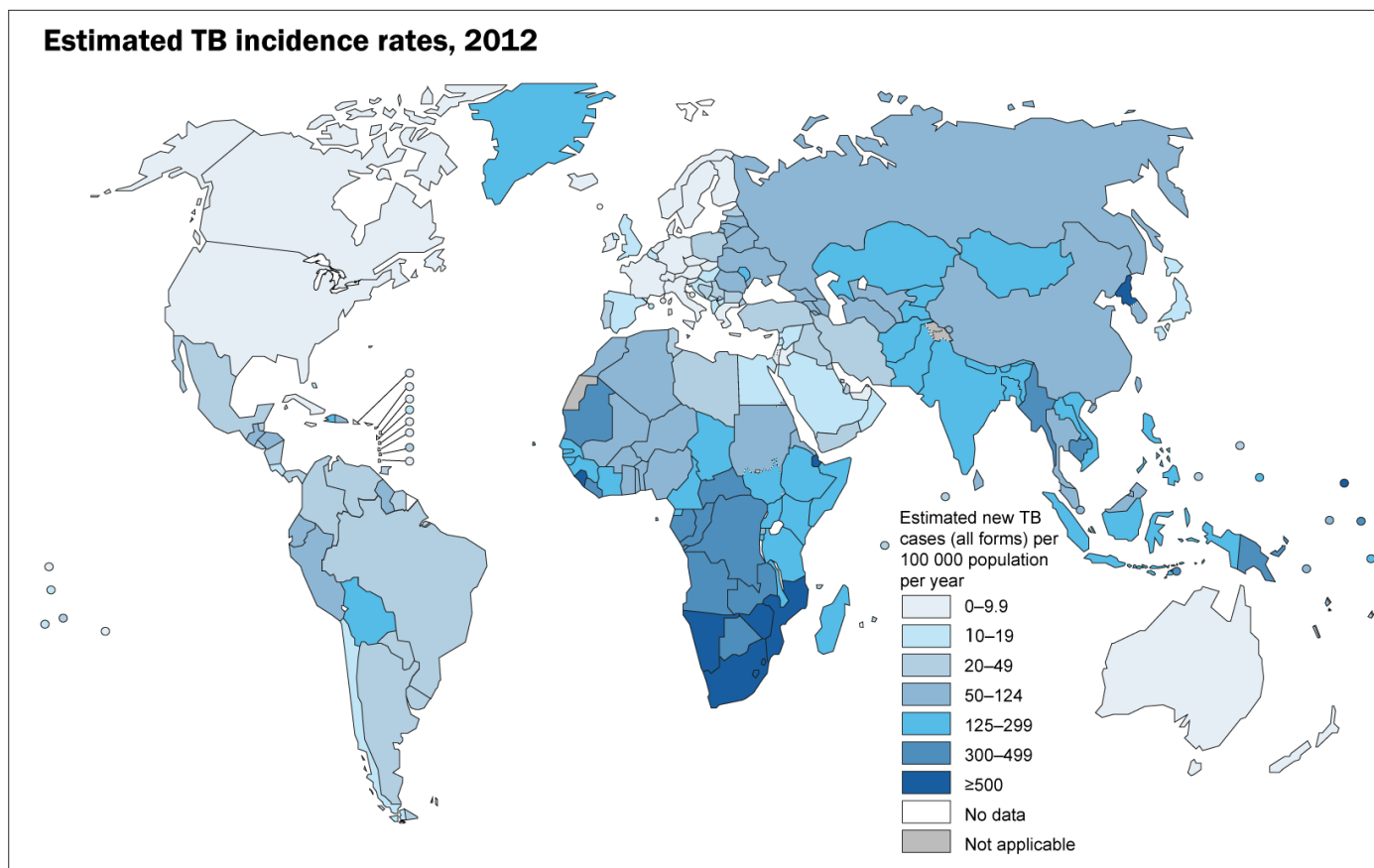
Václav Chmelík, JČU



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.



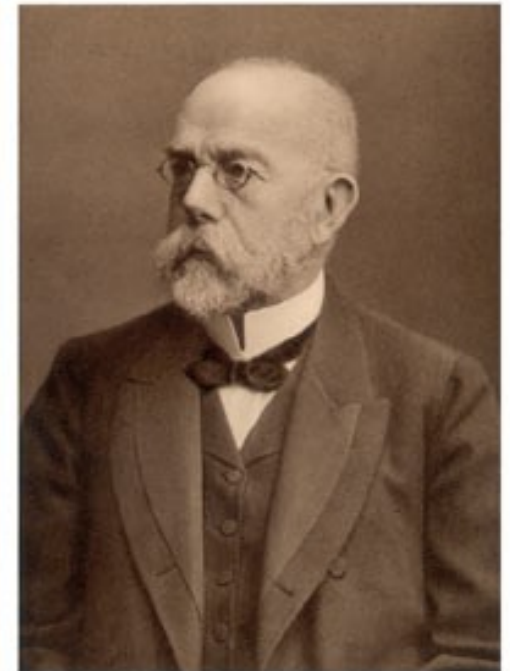
Tuberkulóza

- 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 přežít 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 Ag

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

- mykobakteria pohlcena makrofágy
- množení v makrofázích
- migrace do oblastních uzlin
- aktivace buněčné imunity
- granulóm s nekrotickým středem sýrového vzhledu - kaseifikace
- primární ložisko a odpovídající lymfatická uzlina = primární komplex

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 reinfekci
- 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

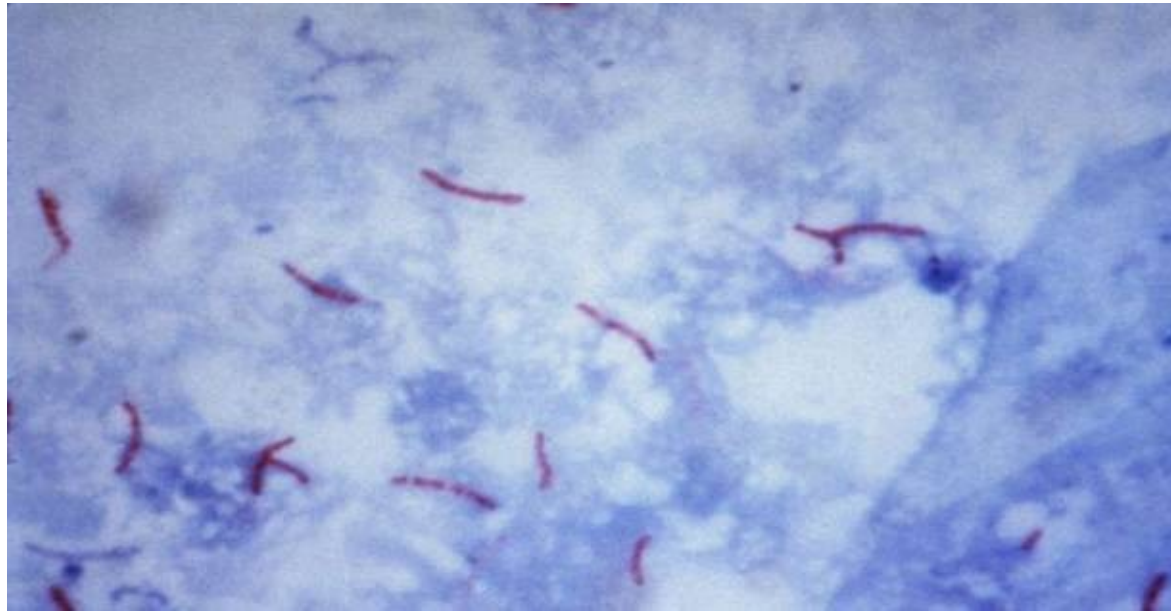
Mikroskopie

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/1mm³

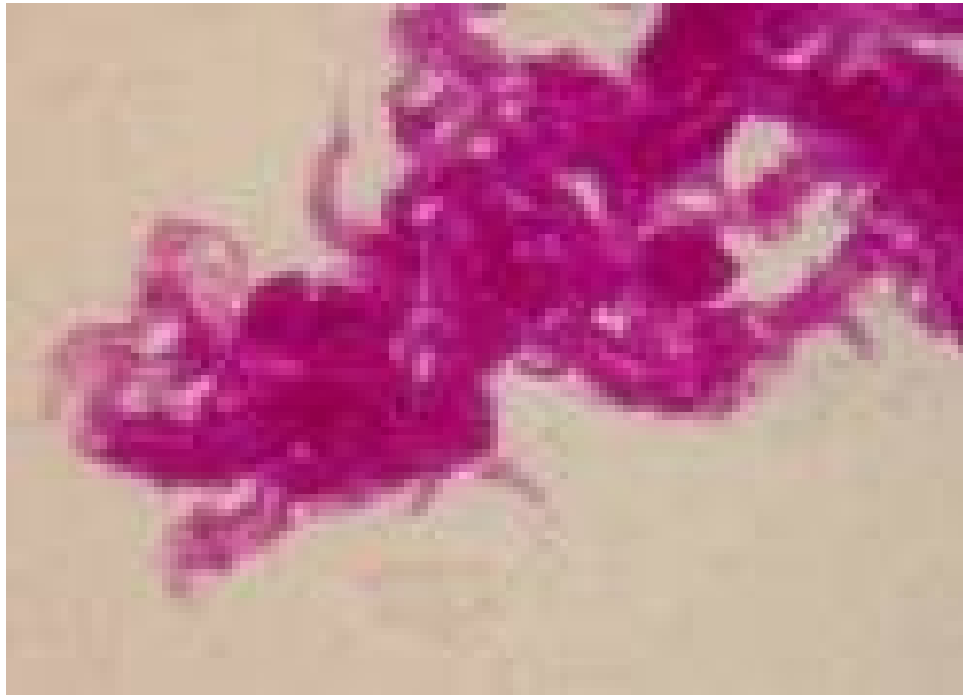
Mikroskopie

- 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



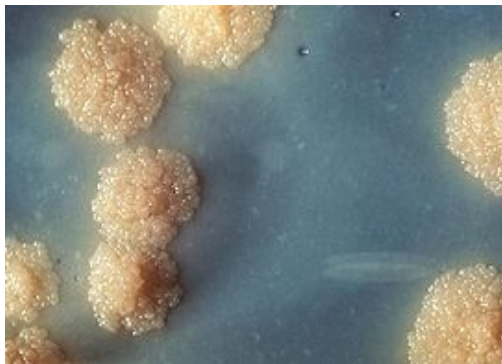
Kultivace

- 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 CO₂



Identifikace

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

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
 - Přímě z materiálu
 - Identifikace z kultury
 - rizika: falešné pozitivivity i negativivity
 - 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

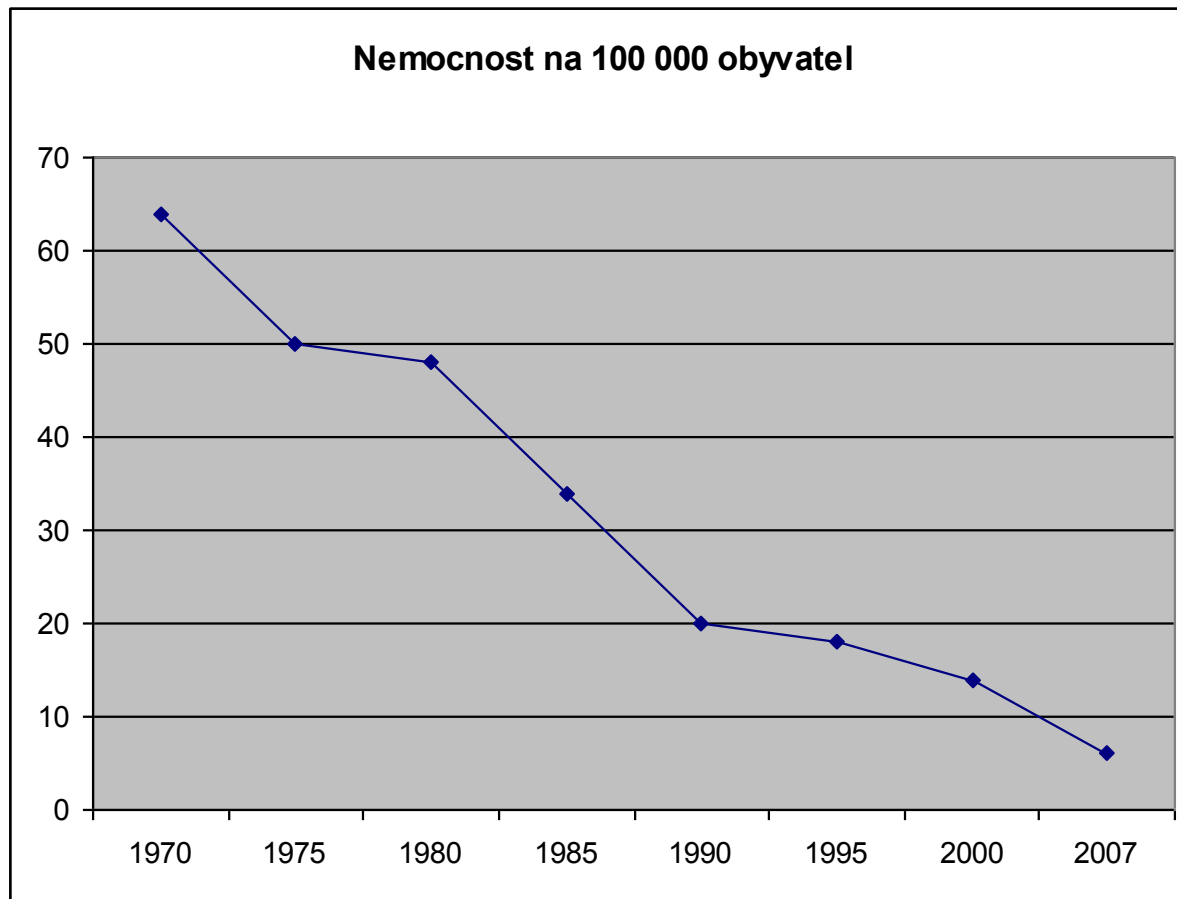
- První fáze: 2 měsíce čtyřkombinace léků
- Poté 6 – 8 měsíců dvojkombinace léků
 - Každá populace obsahuje primárně rezistentní mutanty $1:10^5$ – $1:10^8$
- Základní antituberkulotika
 - isoniazid (INH), rifampicin (RMP), pyrazinamid (PZA), ethambutol (EMB), streptomycin (STM)
- Druhá řada
 - Fluorochinolony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



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

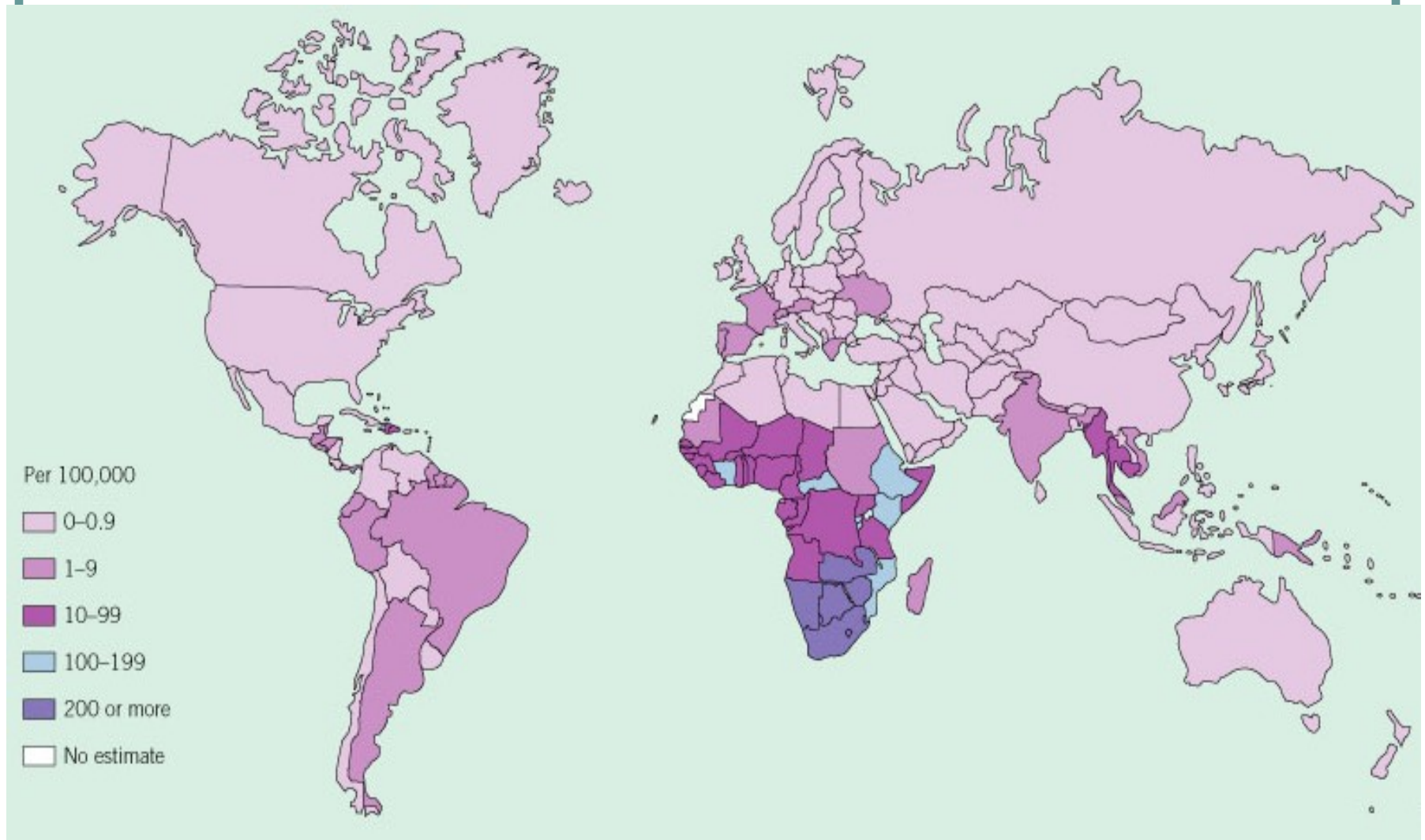
Nemocnost v ČR 2011

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%

Koinfekce HIV a TBC, 2000

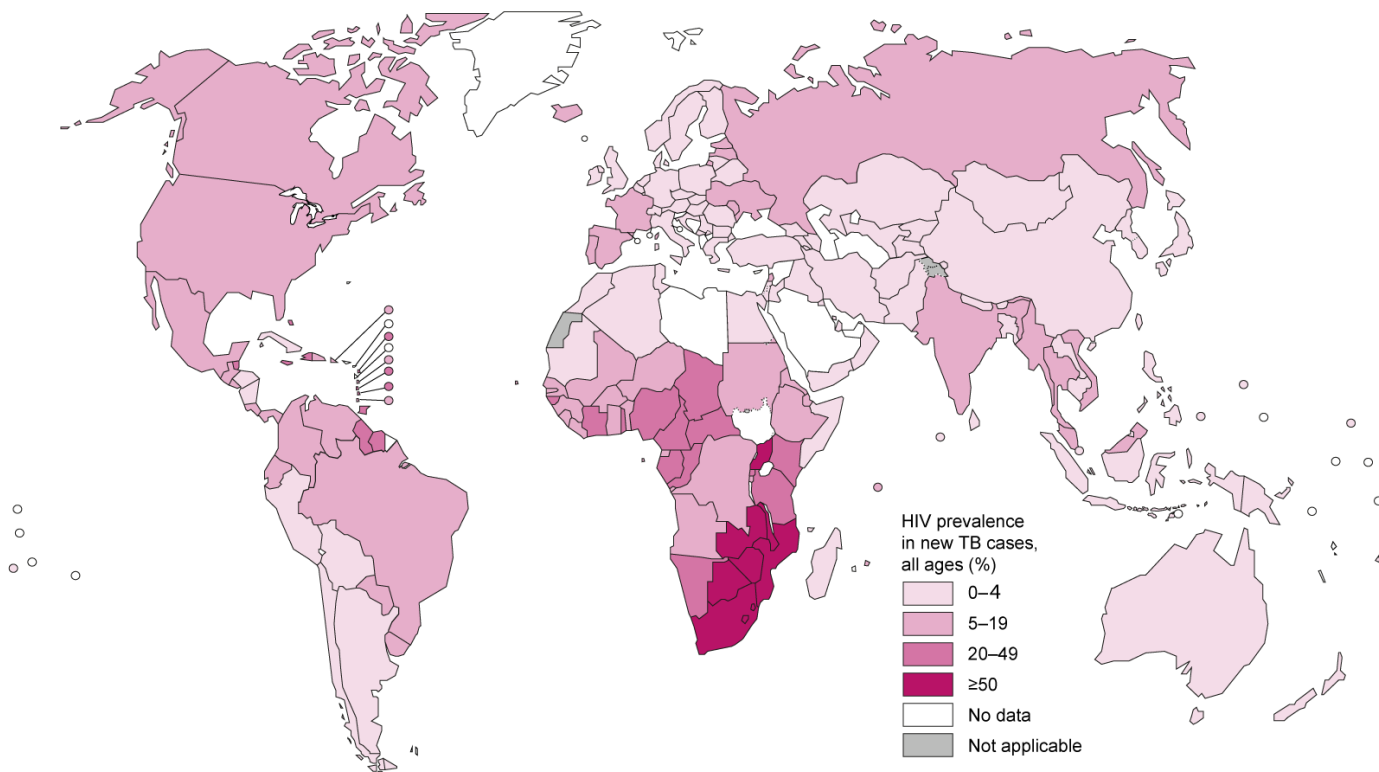
Václav Chmelík, JČU



18.5.2016

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.

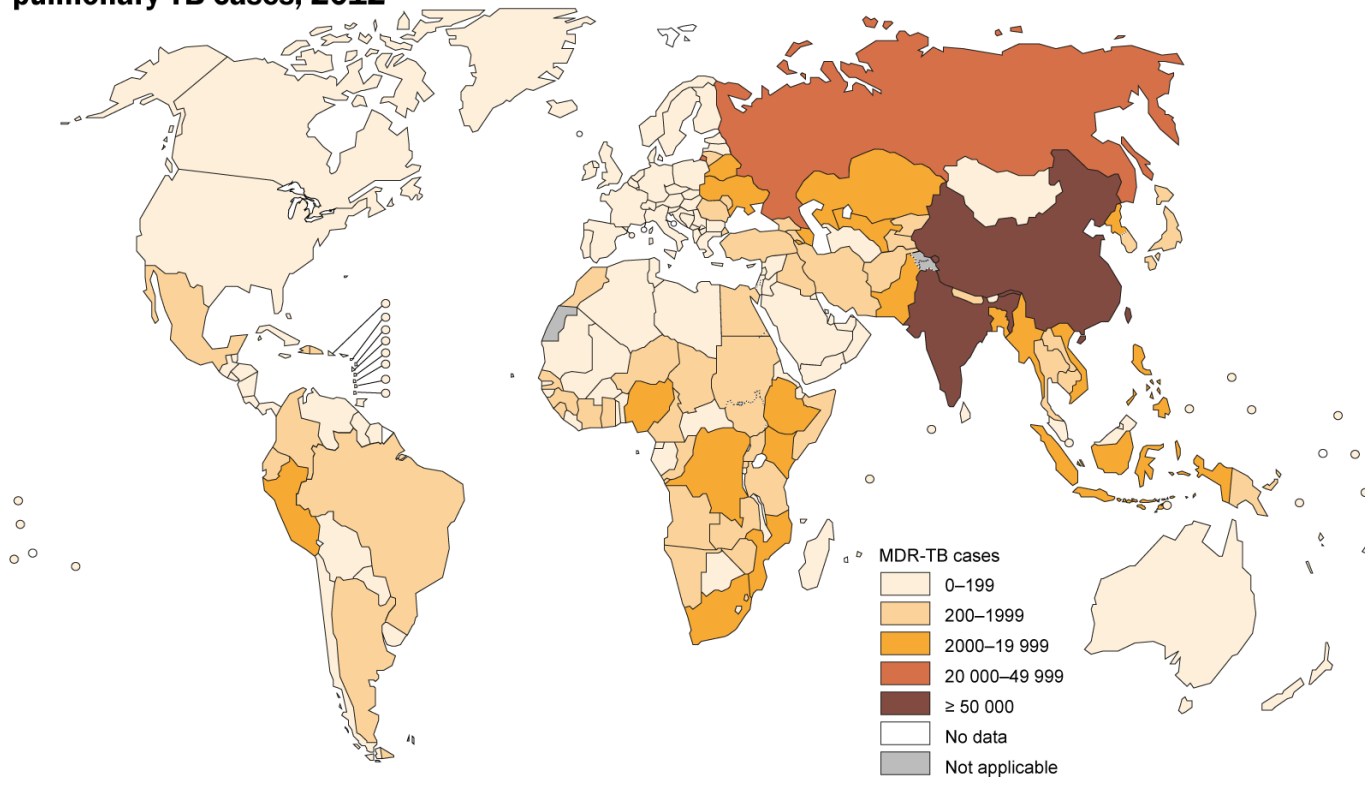
Data Source: *Global Tuberculosis Report 2013*. WHO, 2013.

© 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 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%

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, Norskó



18.5.2016

Museum lepry, Bergen, Norsko



18.5.2016

Museum lepry, Bergen, Norsko

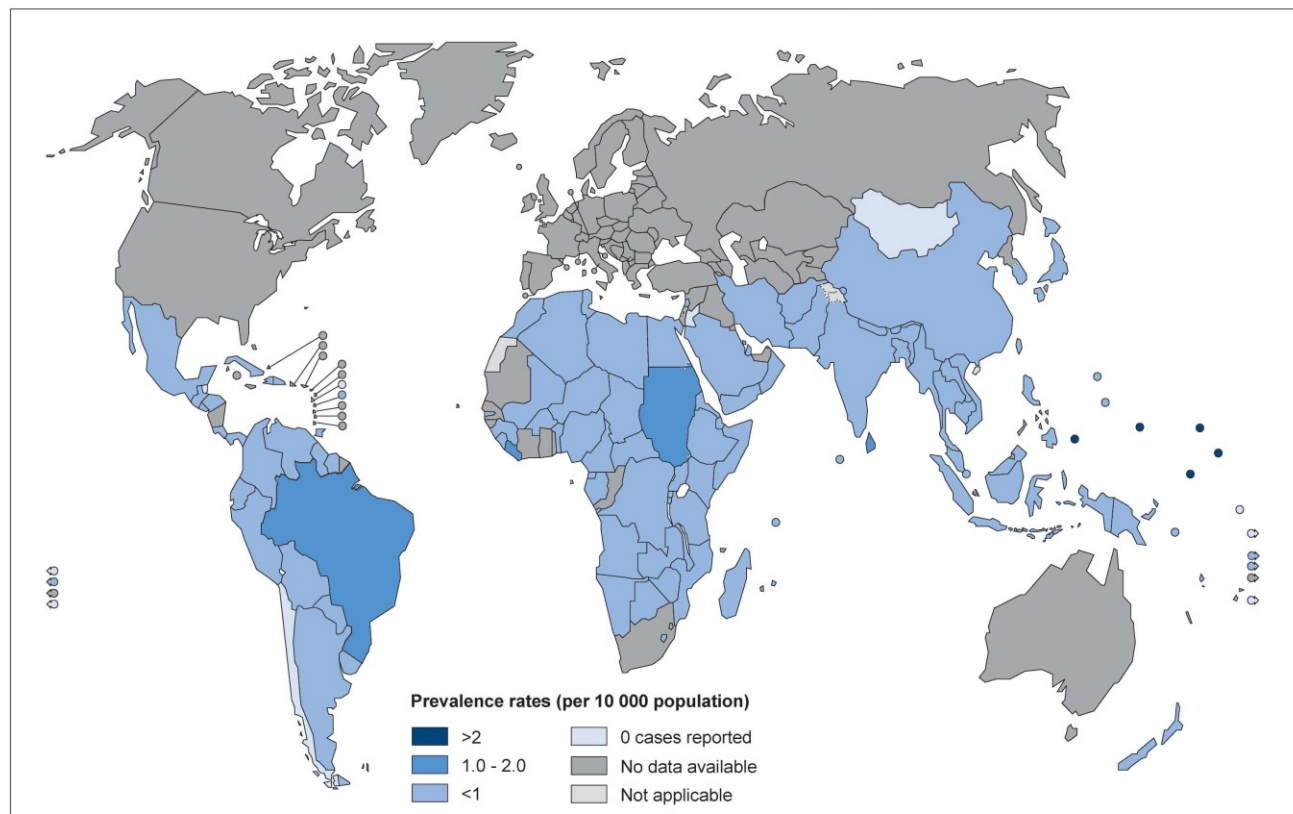


Rumunsko

- 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



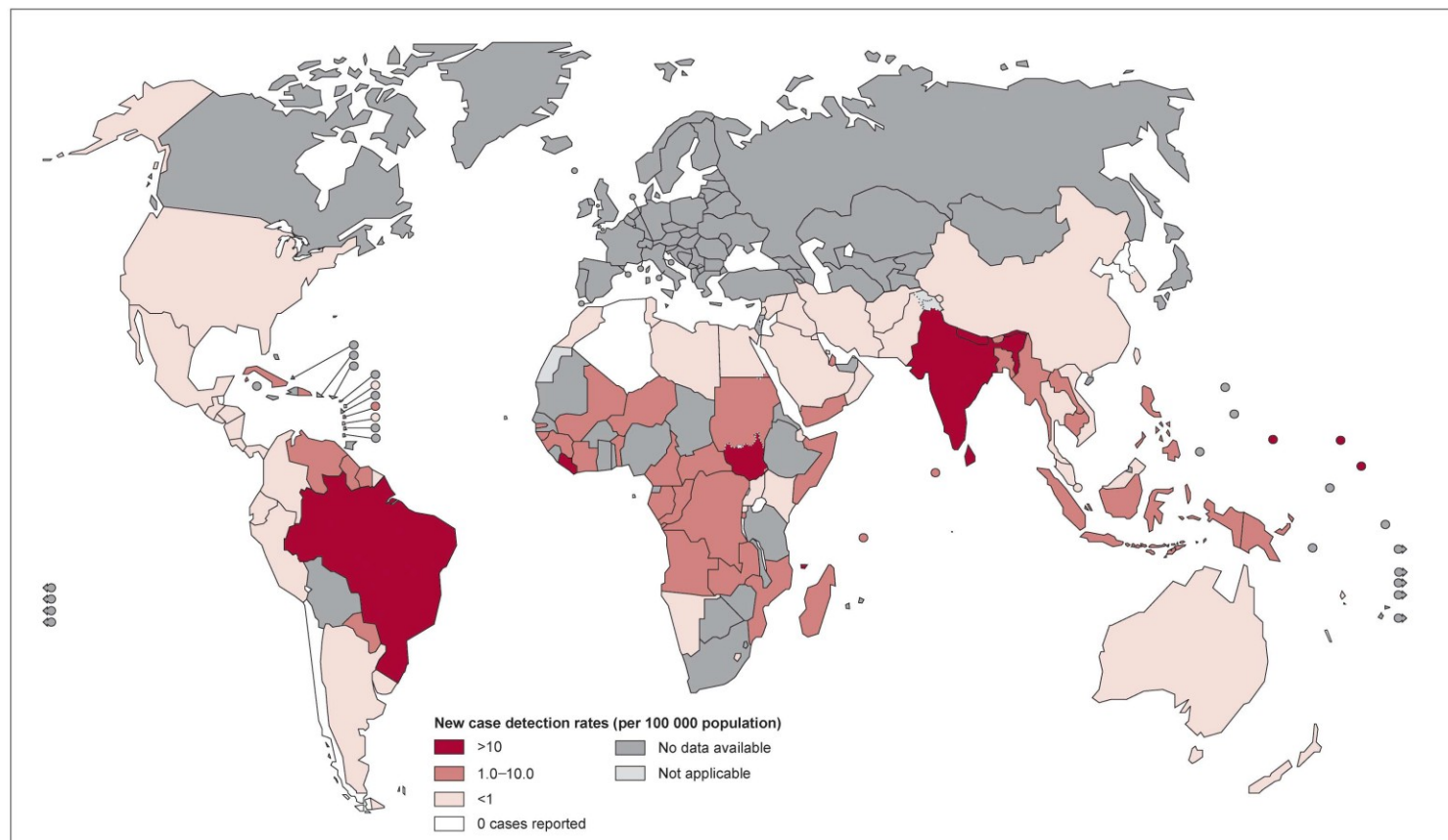
The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers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

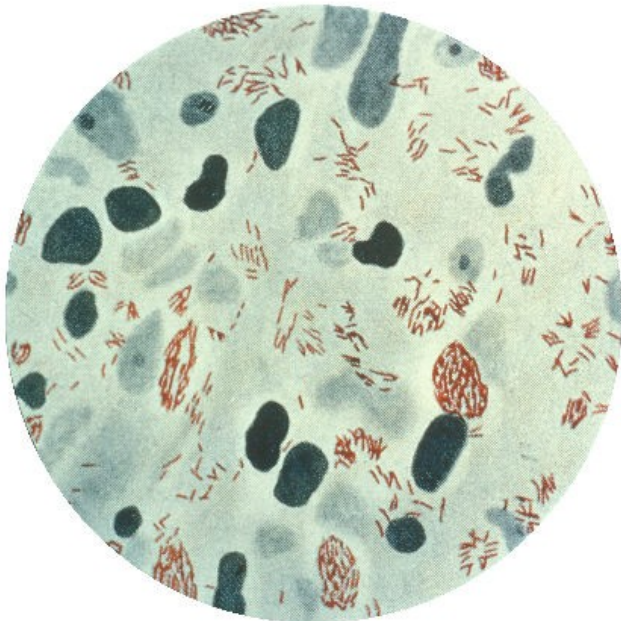
Lepromatózní forma

- 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 malomocnostvím
- Zkouší se kombinovaná vakcína
- Hodnocení nejdříve po 10 letech

Děkuji za pozornost

18.5.2016

