

Téma P08: Laboratorní diagnostika tuberkulózy, aktinomykózy a nokardózy

Ke studiu: *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Nocardia* (učebnice, WWW atd.)

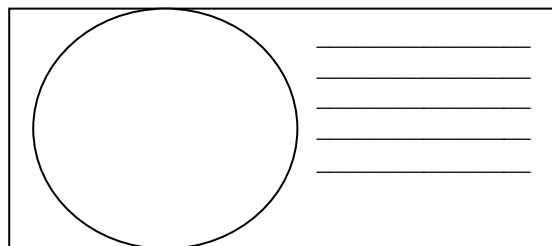
Z jarního semestru: Mikroskopie, kultivace, antimikrobiální citlivost, PCR

Úkol 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 Kinyouna také u některých parazitů (*Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*). Acidorezistentní organismy se barví pouze při zahřátí nebo při použití vysoce koncentrovaného karbolfuchsinu a vysoce koncentrovaného fenolu („studená“ varianta = modifikace podle Kinyouna). Zato je pak neodbarví ani kyselý alkohol (alkohol s anorganickou kyselinou). Poté je odbarvené pozadí obarveno kontrastní barvou – buď zelenou, nebo modrou.



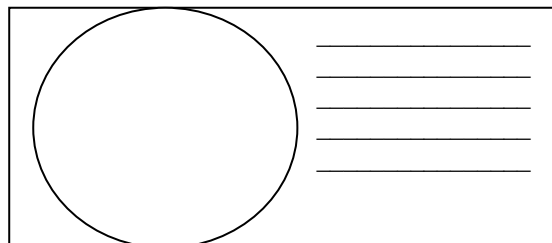
Obarvěte negativní vzorek sputa dle Ziehl-Neelsena (klasická „teplá“ varianta, podvarianta s methylenovou modří). Mikroskopujte. Zde acidorezistentní tyčinky nenaleznete. Zakreslete výsledky, uvidíte především přirozené pozadí, tj. leukocyty, epitelie a další objekty. Nezapomeňte obrázek **popsat** (za použití řádků vedle obrázku).

Popište také 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 _____	_____

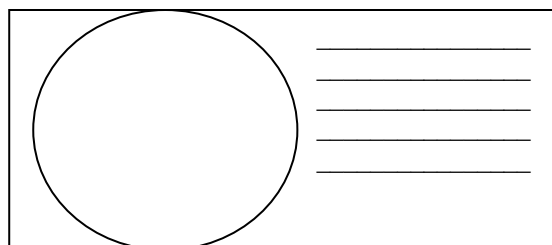
b) Mikroskopie mykobakteriální kultury

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 skličko. Popište a zakreslete pozorované objekty. Povšimněte si velkého polymorfismu organismů (od kokovitého tvaru přes tyčinky až po vlákna, často větvená); grampozitivní, ale často až gramlabilní). Opět obrázek i **popište**.



Úkol 2: Kultivace mykobakterií, aktinomycet a nokardií

Kultivační nároky acidorezistentních a částečně acidorezistentních bakterií jsou velmi různorodé.

- ❖ Pro *Mycobacterium tuberculosis* používáme tekuté (Šula, Banič) 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 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 odečtěte testy citlivosti kmenů mykobakterií na antituberkulotika.

Antituberkulotikum				Kontrola růstu
Růst A/N				
Interpretace				

b) Citlivost na antibiotika u kmenů *Nocardia* a *Actinomyces*

Proveďte in vitro testování citlivosti na antibiotika u nokardií a aktinomycet. Na stole naleznete difusní diskové testy. Do tabulky dopište zkratky antibiotik dle přiložené kartičky a pro všechny testované kmeny změřte zóny citlivosti. Na kartičce máte napsány hraniční zóny – podle nich interpretujte zóny vámi zjištěné jako citlivé (C) či rezistentní (R). „Intermediární“ interpretace v tomto případě nemáme.

Kmen →				
Antibiotikum (celé jméno)	Ø zóny (mm)	Interpretace	Ø zóny (mm)	Interpretace

Úkol 4: PCR v diagnostice TBC

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

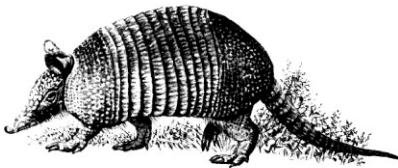
Odečtete výsledek PCR TBC (z prezentace), zapište a interpretujte výsledky

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

Úkol 5: Diagnostika lepry

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

Vyplňte následující tabulku.

	Toto zvíře se jmenuje	
	Používá se k výrobě	
	a tato látka se používá při	

Zdroj obrázku: http://www.1-costaricalink.com/costa_rica_fauna/nine_banded_armadillo.htm

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.