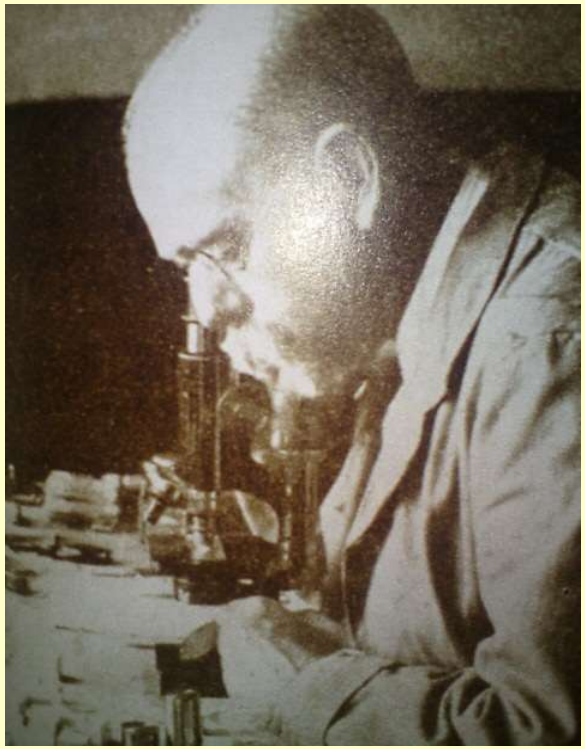
MYKOBAKTERIE

(pomocný studijní materiál určený pro studenty 3.LF)

19. st. – **Robert Koch** – určitý typ bakterií nutné pokládat za původce urč. onemocnění, pokud se vyskytuje pravidelně v souvislosti s touto chorobou, dá se izolovat a kultivovat a po přenesení do zdravého organizmu vyvolá stejné onemocnění – položení základu pro velmi rychle následující objevy početné řady původců inf. onemocnění.

1882 objev bacilu TBC – „ Kochův bacil“



První reálná možnost úspěšně zamezit šíření této nemocni – izolace nemocných, zákaz plivání ve školách a dalších veřejných budovách

V době objevení bacilu Kochem byla TBC jednou z nejč. nemocí – mezi 15 – 40 lety člověka příčinou každého druhého úmrtí.

1905 Nobelova cena
1924 Calmette a Guérin očkovací látka – bacil s oslabenou virulencí
1944 - první lék streptomycin
1950 - kombinace – začátek epochy účinné kombinované chemoterapie TBC
okolo r. 1900 plicní sanatoria pro léčení TBC - helioterapie
- léčení alpským sluncem – lehátkové kůry

Mykobakterie

- acidorezistentní tyčinky – rovné či slabě zahnuté, různá velikost a tloušťka
- nepohyblivé, nesporulující, bez pouzdra
- voskové lipidy ve stěně – hydrofobie
- barvení Ziehl-Nielsen, barvení flourochromy
- rychle a pomalu rostoucí
- tuberkulóza, lepra a ostatní mykobakteriózy
- velmi citlivé na UV záření

Tuberkulóza

- chronické granulomatózní onemocnění
- původce - *M. tuberculosis complex (* nejč. *M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum)*
- přežívání v makrofázích, destrukce tkáně
- zdrojem nákazy nemocný člověk
- vzdušnou cestou (kašel, prach)
- kašel, teplota, noční pocení, úbytek váhy
- inkubační doba 3 – 8 týdnů
- multirezistentní forma tuberkulózy – rezistence na antituberkulotika isoniazid + rifampicin

Terapie TBC

základní antituberkulotika: isoniazid, rifampicin, streptomycin, etambutol, pyrazinamid)

kombinace antituberkulotik
- iniciální fáze min. 2 měsíce + hospitalizace (kombinace 3-4 AT)
- pokračovací fáze min. 3 – 6 měsíců (isoniazid, rifampicin)

v případě rezistence stanovení citlivosti na další léky

Mykobakteriózy

- netuberkulózní mykobakterie (podmíněně patogenní) přes 100 druhů (saprofyti)- půda, voda, zvířata, rostliny

- Postiženi hlavně imunokompromitovaní – s jiným základním (často plicním) onemocněním, HIV, imunosuprese léky
- Ne přenos z člověka na zdravého člověka

- Terapie: obtížná, dlouhodobá (12-24 měsíců)

  vysoká rezistence na léky

  vícečetné kombinace léků

nejčastější původci **mykobakterióz**:

M. avium - pneumonie, lymfadenitidy
M. intracellulare - pneumonie, lymfadenitidy
M. kansasii - chronická plicní on. (horníci)
M. xenopi – pneumonie
M. fortuitum – infekce ran, osteomyelitidy
M. scrofulaceum – postižení krčních uzlin
M. marinum – kožní granulomy (*swimming pool granulomas*, akvária!)

Diagnostika stejná pro všechny mykobakterie

ODBĚR VZORKU

(platí obecně pro mikrobiologii!)

- Základní předpoklad kvalitního výsledku mikrobiologického vyšetření – správně provedený odběr infekčního materiálu!
- sterilní odběrové zkumavky
- zajištění transportu tak, aby nedošlo ke znehodnocení
- včasné dodání
- řádná dokumentace

VZOREK

- adekvátní lokalizaci onemocnění

adekvátní formě onemocnění

ODBĚROVÁ NÁDOBKA

- různá pro jednotlivá vyšetření
- řádně označena
- dobře uzavřená
- neznečištěna na povrchu materiálemí
- dostatečné množství a kvalita

PRŮVODNÍ LIST

- v plastikovém pytlíku zvlášť, aby nedošlo ke kontaminaci inf. materiálem
- odesílatel
- název zařízení
- IČZ, adresa
- lékař + odbornost (telefon pro rychlou komunikaci)
- příjmení a jméno pacienta
- rodné číslo
- zdravotní pojišťovna
- kód diagnózy
- druh vzorku (popř. originální číslo)
- požadované vyšetření
- datum odběru
- čitelně!

PROVEDENÍ ODBĚRU (platí pro mykobakterie)

Sputum

- ráno na lačno před ústní hygienou
- několikrát zakašlat se zavřenými ústy
- do průhledné odběrové nádobky se širokým hrdlem
- možno den po podání expektorancií či inhalaci
- 2-5 ml
- 3 po sobě následující dny

Bronchoalveolární laváž

✓děti
✓imunokompromitované osoby

Žaludeční výplach

- nalačno žaludeční sondou
- malé děti – vypijí před odběrem 50 ml sterilního fyziologického roztoku

Moč

- ráno střední proud moči
- sterilní nádobka se širokým hrdlem
- 3 dny po sobě
- 50 – 100 ml

Výtěry a stěry z píštělí, hnisavých procesů a ran
- na 3 laryngeální sondy zvlhčené v destilované vodě
- tekutý materiál do injekční stříkačky (v ní možný transport do laboratoře)

Menstruační krev
- první 3 dny menstruace
- sterilní tampón z gázy zaveden na 3 hodiny do pochvy
- lépe vzorek z kyretáže

Likvor, pleurální výpotek, punktát
- 3 -5 ml, asepticky

Stolice
- do parazitologických zkumavek
- vzorek velikosti lískového ořechu

Bioptický a sekční materiál
- cca 2 cm
- nepřidávat fixační ani konzervační prostředek

Laryngeální výtěr
- nízká citlivost pro průkaz mykobakterií
- vysoké riziko infekce při odběru

!!! Pro odběr vzorků na vyšetření molekulárními metodami platí stejně, protože je paralelně vyšetřován klasickými metodami !!!

METODY PRŮKAZU MYKOBAKTERIÍ

zpracování vzorků – dekontaminace HCl či NaOH

Mikroskopie

- nález ART (nejzávažnější zdroj nákazy)
- výsledek k dispozici do 24 hodin
- navazuje kultivace
- málo citlivá metoda - nutnost 10^5 až 10^6 mykobaktérií v 1ml

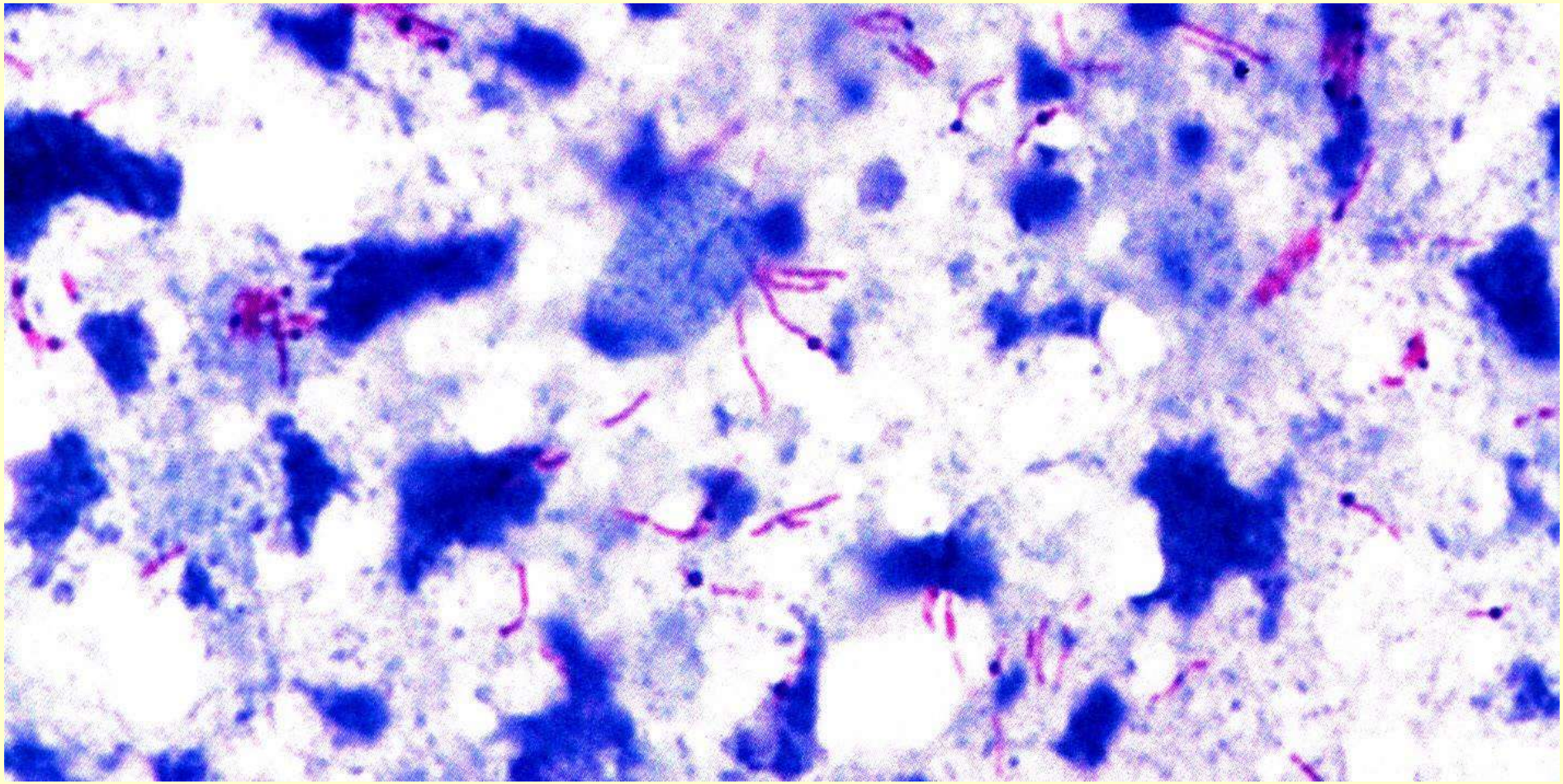
barvení podle Ziehl-Neelsena (imerzní mikroskop)
– mikroskopie ve viditelném světle

barvení fluorochromy (fluorescenční mikroskop)
– mikroskopie v UV světle

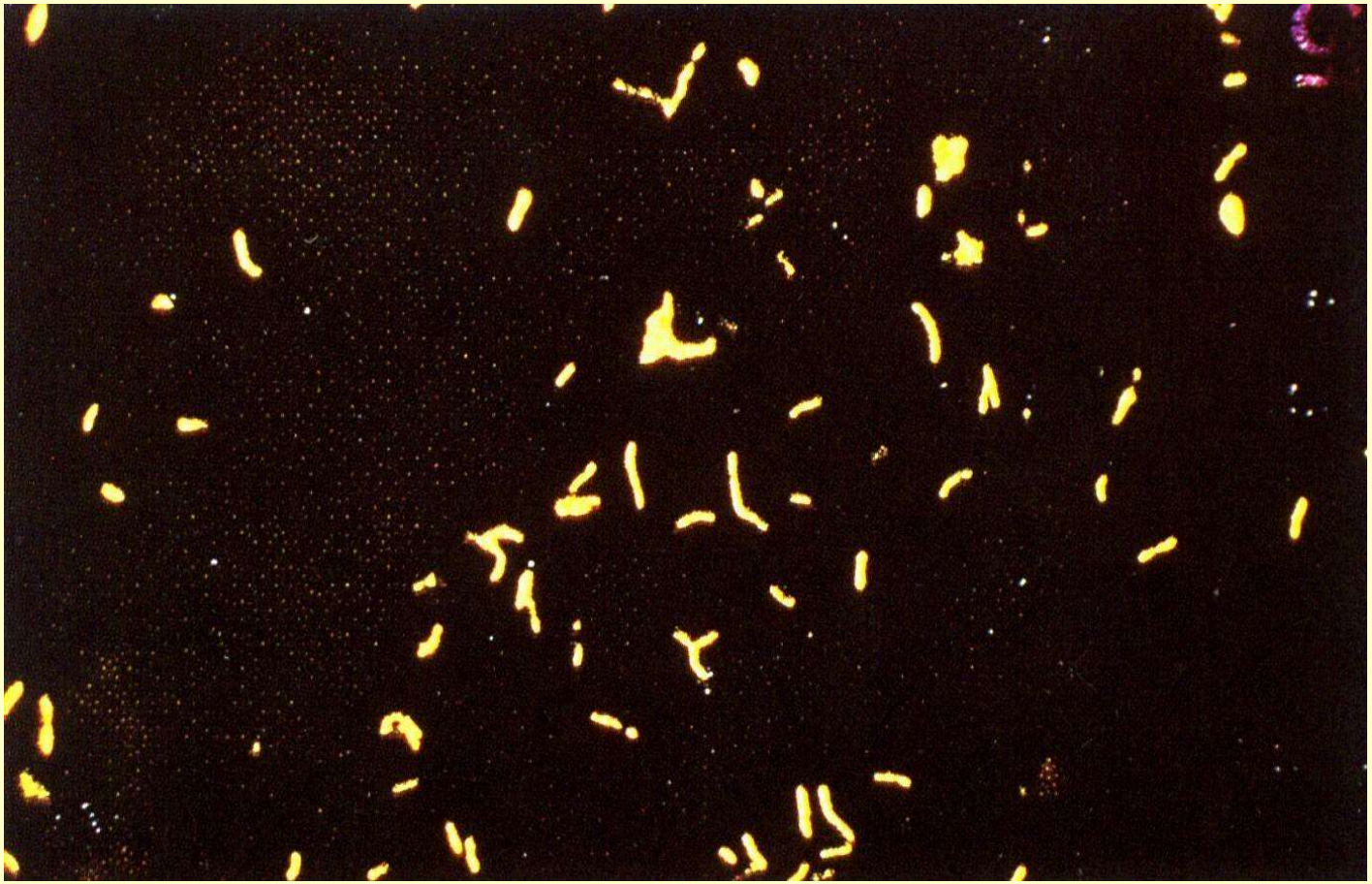
Sdělení lékaři : „ ART nalezeny, ART nenalezeny “

Pozitivní nález hlášen ihned po zjištění.

Barvení podle Z-N – binokulární mikroskop s imerzním objektivem, zvětšení 100x, 50 zorných polí,červené tyčinky na zeleném či modrém pozadí



Fluorescenční mikroskopie –fluorescenční mikroskop,suchý objektiv, zvětšení 160 až 400x, UV lampa, 25 zorných polí, zářící žlutozelené tyčinky na temně červeném pozadí



Kultivace

klasická – pevné (Loewenstein-Jensen) a tekuté půdy (Šula)

- kolonie různé morfologie
- 3,6,9,12 týdnů
- navazuje identif.druhů + testy citlivosti na AT
- předpoklad pozitivity : 10^2 až 10^3 mykobaktérií v 1 ml vzorku
- inkubace : 30°C, 37°C, 42°C

urychlená – „ metabolické “ metody v automatizovaných detekčních systémech

- detekce produktů metabolické aktivity mykobaktérií během růstu v tekutém médiu
- monitorování změn kvantity oxidu uhličitého nebo kyslíku
- urychlení kultivace o 2 až 3 týdny, výsledek k dispozici od 5.dne

BACTEC, MB/BacT, MGIT

Detekční systém Bactec MGIT 960 (B-D)

Identifikace

klasická

morfologie makrokolonií

pevná půda – velikost a povrch kolonií

tekutá půda – sediment x zákal

pigmentace

citlivost na AT

růst při různých teplotách

test fotochromogenity – změna barvy kolonií ozářením světlem

molekulární

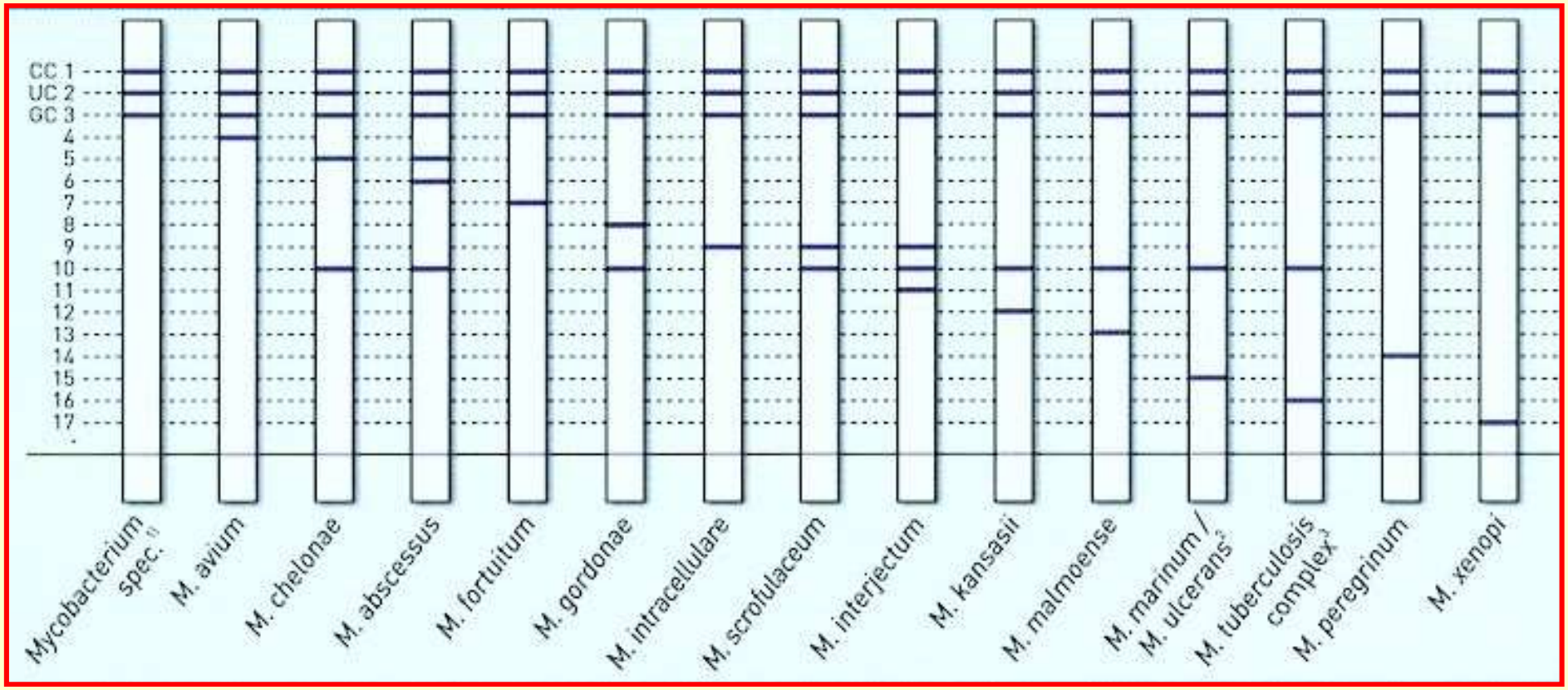
dg.soupravy Genotype

- hybridizace izolované amplifikované DNA s příslušnými specifickými sondami fixovanými na proužcích nitrocelulózové membrány (strip)
- vizualizace vazby (barevný proužek na stripu) dle lokalizace proužků

určení mykobakteriální species

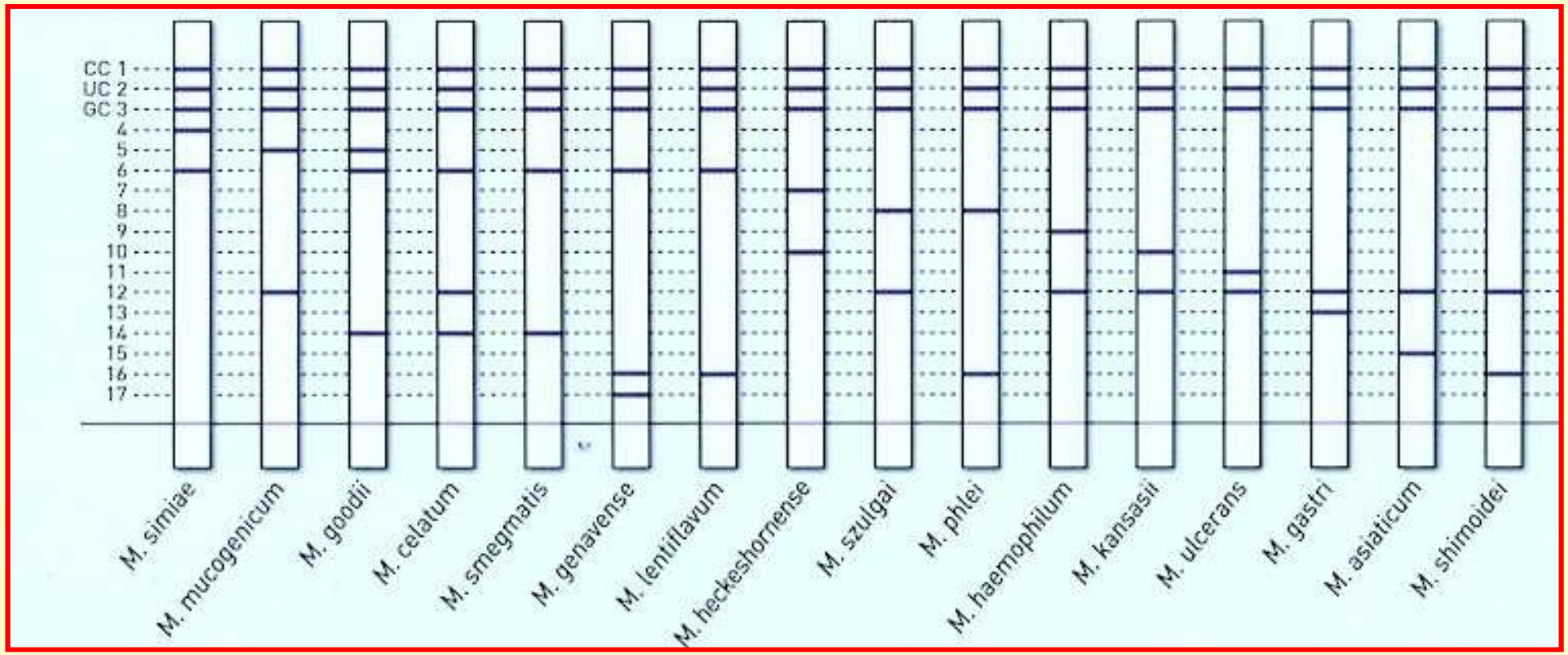
GenoType Mycobacterium CM
(Common Mycobacteria)

13 „klinicky relevantních“ NTM + MT komplex



GenoType Mycobacterium AS
(Additional Species)

dalších 16 druhů NTM

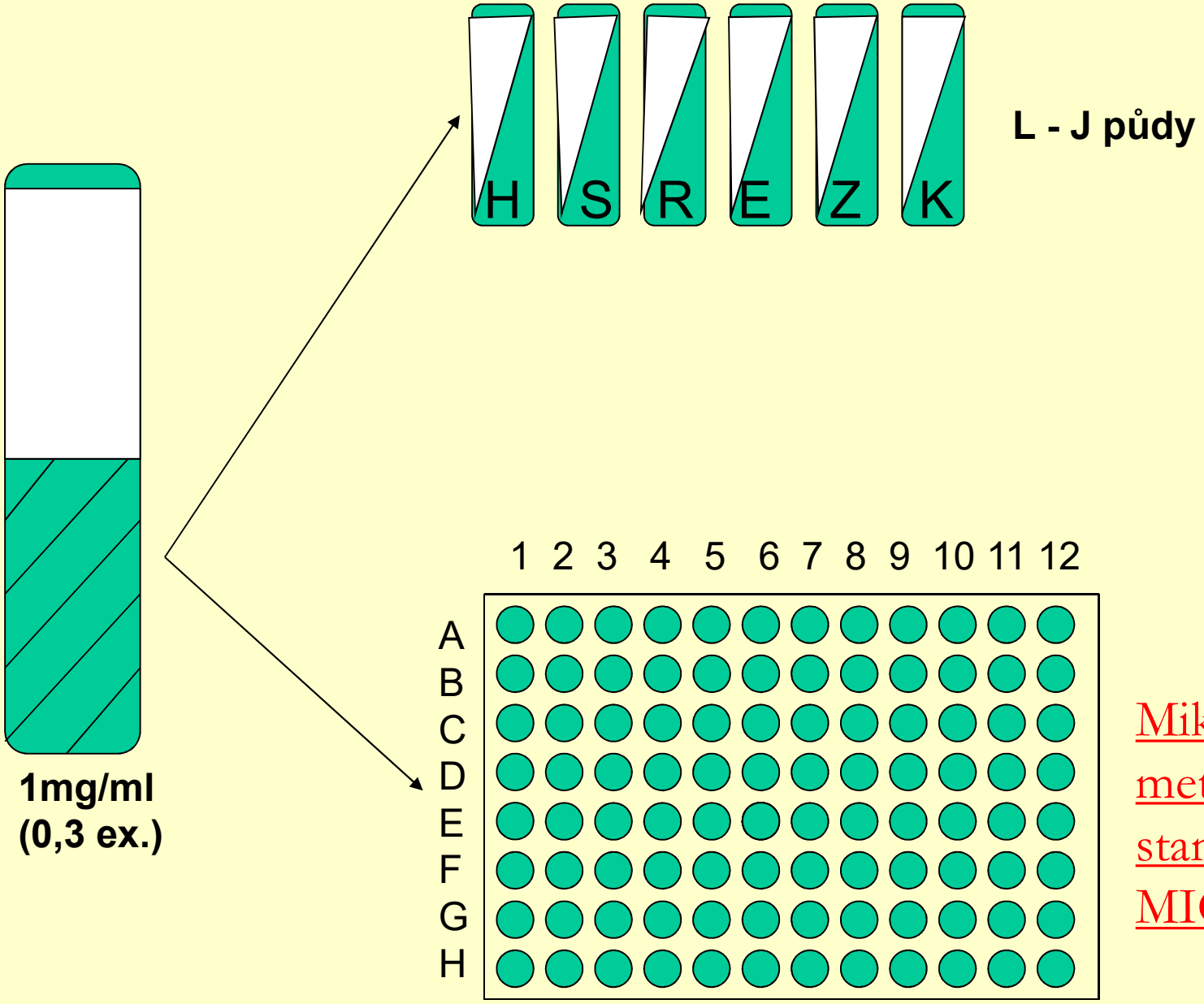


Testy citlivosti na AT

klasické – proporční metoda dle Canettiho v tekutých médiích
detekčních systémů (MGIT) nebo na pevných L-J půdách
stanovení MIC – v tekutém médiu v mikrotitrační destičce
molekulární – Genotype – reverzní hybridizace

Proporční metoda dle Canettiho
zkumavky s L-J půdou+ AT
délka růstu dle druhu mykobakteria
nárůst kolonií = rezistence na dané AT
Stanovení lékové citlivosti mikrometodou – stanovení MIC
mikrotitační destička 96 jamek
Šulova tekutá půda + testovaný lék ředěný geometrickou řadou
inkubace 3 až 14 dní
inverzní mikroskop zvětšení 40x
dobře viditelné mikrokolonie

Proporční metoda dle Canettiho



Mikrodiluční metoda, stanovení MIC

QuantiFERON®-TB Gold IT (QFT)

(Cellestis International Ltd., Carnegie,Victoria, Australia)

QFT umožňuje diagnostiku latentní tuberkulózní infekce i aktivního onemocnění

In vitro - nepřímý test

Test IFN – gamma z plné krve hodnotící reakci
na 3 peptidové antigeny

ELISA – enzymová imunoanalýza

Hodnotí infekci + onemocnění M.tbc
+ rtg + klinika + dg. vyšetření

Princip metody

M. tbc - mykobakteriální proteiny (peptid. antigeny) → člověk – lymfocyty rozpoznají → produkce INF gamma → detekce a kvantifikace

Mykobakteriální proteiny chybí u BCG a ve většině netuberkulózních mykobaktérií

Odběr krve na QFN

1. do 3 speciálních zkumavek
2. 1ml nalačno
3. plná krev
4. Protřepat
5. do 16 hod. po odběru do laboratoře
6. inkubace do druhého dne v termostatu

zkumavky: negativní kontrola
peptidy
mitogen – pozitivní kontrola

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ:

„pozitivní“ = *infekce pravděpodobná*
„negativní“ = *infekce nepravděpodobná*
„neurčeno“ = *nelze hodnotit*