

Mycobacterium

Mykobaktérie

nepohyblivé,	obsahujúce lipidy v BS
nesporulujúce aeróbne paličky,	príležitostne vytvárajúce vlákna,
acidorezistentné	kultivačne náročné
nefarbiace sa Gramovým	pomaly rastúce

41 druhov (species) z toho 27 izolovaných u ľudí

z toho 95% spôsobených

M.tbc, *M. avium-intracelulare*, *M.kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*

M. leprae.

Mykobaktérie sú acidorezistenté paličky, ktoré odolávajú odfarbeniu silnými kyselinami s alkoholom. Majú veľmi dlhú generačnú dobu. Bunková stena, obsahujúca veľké množstvo lipidov, mastných kyselín a voskov, poskytuje mykobaktériám ochranu napríklad pred vyschnutím, kyselinami alebo zásadami. Je tiež adjuvantnou látkou stimulujúcou humorálnu a hlavne bunkovú imunitu. Mykobaktérie produkujú dimykolát trehalózy („cord faktor“), ktorý je zodpovedný za ich charakteristické usporiadanie (povrazce, hadovité usporiadanie). *Mycobacterium tuberculosis* je rozšírené na celom svete. Rezervoárom je človek, infekcia sa šíri najčastejšie inhaláciou infikovaného aerosolu. Riziko nákazy je zvýšené u imunikompromitovaných pacientov (vrátane osôb s AIDS), u alkoholikov, užívateľov drog alebo u osôb, ktoré sú v priamom kontakte s infikovanými pacientmi.

Klasifikácia mykobaktérií

Pomaly rastúce

-*Mycobacterium tuberculosis* complex

Mycobacterium tuberculosis,

Mycobacterium leprae,

M.bovis, *M.ulcerans*

Atypické mykobaktérie – klasifikácia podľa Runyona

M.kansasii, *M.marinum*

fotochromatické

M.scrofulaceum

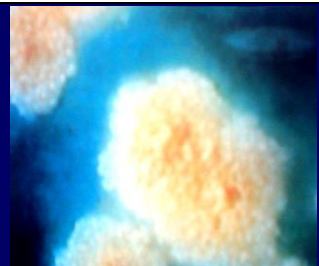
skotochromatické

M.avium, *M.intracelulare*

pomaly rastúce nepigmentované

M.fortuitum, *M.chelonae*

rýchlorastúce nepigmentované



Klasifikácia mykobaktérií je založená na rastových vlastnostiach a na morfológii kolónií: Mycobacterium tuberculosis komplex – zahŕňa M. tuberculosis a podobné mykobaktérie. Sú to pomaly rastúce mykobaktérie, ktoré vytvárajú buď nepigmentované kolónie, alebo kolónie so slabou pigmentáciou (svetložlté). Do tejto skupiny patria: M. tuberculosis, M. leprae, M. africanum, M. bovis, M. bovis BCG (bacillus Calmette-Guérin). Ostatné mykobaktérie, v odbornej literatúre označované aj ako netuberkulózne mykobaktérie, sú rozdelené na základe Runyonovej klasifikácie.

Klasifikácia podľa Runyona: I. skupina – pomaly rastúce fotochromogénne – produkujú pigment na svetle (M. kansasii, M. marinum) II. skupina – skotochromogénne – produkujú pigment v tme aj na svetle (M. gordonae) III. skupina - pomaly rastúce nepigmentované (M. avium, M. intracellulare) IV. skupina - rýchlorastúce nepigmentované (M. fortuitum, M. chelonae, M. abscessus) Pigmentované mykobaktérie produkujú intenzívne žlté karotenoidy.

Mycobacterium – rod (genus)

Bunková stena

bohatá na lipidy = hydrofóbny povrch

= rezistentné na dezinfekciu

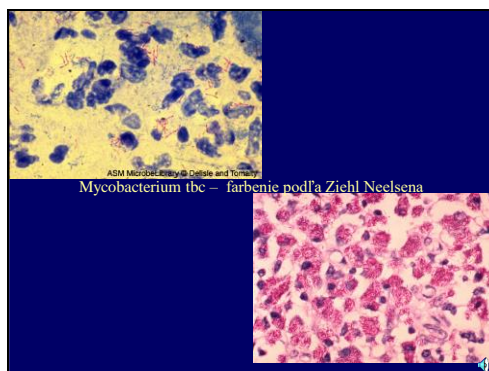
= neprijímajú farbivo, ale ak sa zafarbia

(špeciálna procedúra – zahriatie sc.Ziehl Neelsena)

odolávajú odfarbeniu aj silným kyselinám

= acidorezistentné

Vzhľadom na vysoký podiel lipidov a voskov v bunkovej stene acidorezistentných baktérií sa na ich farbenie používa špeciálna metodika. **Farbenie podľa Ziehl-Neelsena** je založené na aplikácii koncentrovaného karbolfuchsínu na fixovaný preparát. Preparát sa zahrieva trikrát do výstupu pár (3-6 minút). Acidorezistentné baktérie ostávajú zafarbené aj po opláchnutí preparátu silnými kyselinami (podstata acidorezistentného farbenia). Na dofarbenie sa použije metylénová modrá alebo malachitová zelená. **Acidorezistentné baktérie majú ružovočervenú farbu.**



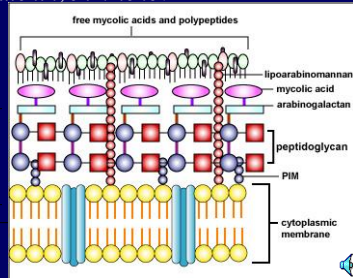
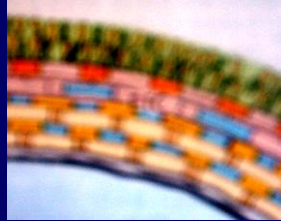
Bunková stena – komplexná

Peptidoglykan (*rigídita celej štruktúry*) s fosfodiestericky viazanými molekulami

D - arabinozy a D - galaktozy na mykolovú kyselinu (*najvýznamnejší lipid v bunkovej stene*).

s voľnými lipidmi (vosky, mykozidy – cord factor) – *zodpovedný za paralelné radenie sa bacilov u virulentných kmeňov*

polypeptidmi (PPD) na povrchu.



Patogenéza infekcie

Deštrukcia tkaniva a fibróza – spôsobená účinkom imunitnej odpovede hostiteľa na infekciu *M.tbc*

Intracelulárny parazit – uniká vrodenným imunitným mechanizmom

Tuberkulóza – klasické mykobakteriálne ochorenie vzniká po *inhalácii M.tbc*

* *pohltenie alveolárnymi makrofágmi*

* *rozmnožovanie intracelulárne* unikajú imunitným mechanizmom a deštruujú fagocyty, ktoré ich pohltili.

* *opakovanie tohto procesu* (fagocytóza bacilov, replikácia *M.tbc*, lýza bb. = mnoholaločnaté obrovské bunky nahromadených makrofágov „Langhansove bb“)

* *infikované makrofágy sa šíria* do lokálnych uzlín, krvného riečišťa, kostnej drene, sleziny, ľadvín, kostí CNS...)

Prameňom infekcie je najčastejšie chorý človek. Mykobaktérie sa šíria vzdušnou cestou a do organizmu vstupujú dýchacími cestami inhaláciou drobných infekčných kvapôčok. Človek chorý na TBC pri pľúcnej forme vylučuje mykobaktérie z organizmu vykašľaním spúta, pri urogenitálnej alebo črevnej forme močom, stolicou. Vstupnou bránou infekcie je najčastejšie dýchací systém, o čom svedčí aj vysoký podiel pľúcnej TBC, ktorá tvorí 80 - 90 % všetkých foriem TBC. Zvýšenú citlivosť voči infekcii TBC majú oslabení jednotlivci (imunodeficiencia a infekcia HIV), starší jedinci a ľudia s polymorbiditou, hlavne pri cukrovke, vredovej chorobe žalúdka, alkoholizme, narkománii alebo pri liečbe kortikoidmi a imunosupresívami. Tuberkulóza je chronicky prebiehajúca infekčná choroba spôsobená predovšetkým bacilmi *Mycobacterium tuberculosis* (95 % prípadov).

Hlavným cieľovým orgánom sú pľúca, ale mykobaktérie môžu spôsobiť chorobný proces aj v mimopľúcnych štruktúrach. Rozdelenie orgánového postihnutia podľa posledných kritérií SZO je nasledovné:

1. Pľúcna tuberkulóza, ktorá postihuje parenchým pľúc. Nepatrí sem tuberkulóza vnútrohruďných uzlín, ani zápal pohrudnice s pohrudničným výpotkom, ak nie je súčasne prítomný rtg nález v pľúcnom parenchýme.

2. Mimoplúcna (extrapulmonálna) tuberkulóza postihuje mimoplúcne štruktúry. Závažnými formami sú meningitída (zápal mozgových blán), perikarditída (zápal osrdcovníka), peritonitída (zápal pobrušnice), extenzívny pleurálny (pohrudnicový) výpotok, spinálna, intestinálna (črevná) a urogenitálna (močopohlavná) tuberkulóza.

Latentná (subklinická) tuberkulózná infekcia znamená usídlenie tuberkulózných mykobaktérií v organizme, ktoré však nevyvolávajú ochorenie. Len asi 10 – 15 % latentne infikovaných osôb skutočne ochorie na aktívnu tuberkulózu. Rozvoj latentnej formy tuberkulózy v aktívnu formu môže prebiehať počas niekoľkých desiatok rokov a vzniká vtedy, ak dôjde z rôznych dôvodov k oslabeniu funkcie obranných mechanizmov človeka.

2-4 týždne po infikovaní – špecifická imunitná odpoveď

Cytokíny produkované CD4 T lymfocytmi aktivujú makrofágy a tie sú schopné zabíjať baktérie:

malá antigénna záťaž – malé tkanivové poškodenie

veľká antigénna záťaž (masívna infekcia) – veľké tkanivové poškodenie (nekróza)

Účinnosť eliminácie baktérie závisí na veľkosti a lokalizácii infekcie:

lokalizované nahromadenie aktivovaných makrofágov

(*granulóm* < 3 mm): makrofágy penetrujú dnu a zabíjajú baktérie, zábrana šírenia

rozsiahlejšie nekrózy, kazeózne granulómy – obkolesené fibrínom, baktérie prežívajú vo vnútri, môžu byť reaktivované aj po rokoch

Laboratórna diagnostika

Mikroskopia rýchla dg, Ziehl Neelsen, fluorescencia, príprava vzorky,

Kultivácia ranné spútum 3 dni za sebou alebo veľké množstvo inej tekutiny – moč,

* *pomalý rast*

* prerastenie kontamin. flóry -

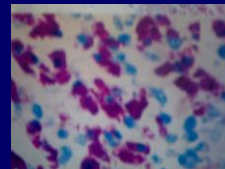
* *dekontaminácia* NaOH,

* použitie vaječných (Šulova, Lowensteinova) a tuhých agarových pód.

* Urýchlenie za použitia detekcie metabolizmu kys. palmitovej a CO₂

Genetické sondy detekcia sekvencie aminokyselín špecifických pre M.tbc, skrátenie na 6 hodín, priamo z biol.materiálu

Serológia necitlivé a nešpecifické



Mikrobiologické vyšetrenie biologického materiálu, najčastejšie spúta, sa opiera o klasické a molekulárno-biologické vyšetrovacie postupy. V každom prípade ide o priamy dôkaz M. tuberculosis komplexu. Medzi prvé zaradujeme jednak **mikroskopický dôkaz mykobaktérií**, t. j. acidorezistentných paličiek v preparáte z biologického materiálu farbenom podľa Ziehl-Neelsena, jednak kultivačný dôkaz tuberkulózných bacilov izolovaných z infekčných biologických vzoriek po ich spracovaní. Mykobaktérie majú dlhú generačnú dobu, kultivačný

čas sa predlzuje na 6 tyzdňov. Pouzivaju sa tuhe selektivne pody na vaječnj báze (Löwenstein – Jensen médium) alebo s agarom (Middlebrookova pöda). **Kultivácia** sa robí aj na tekutých pödach, ktoré môžu podporovať rýchlejši rast niektorých mykobaktérií. Mykobaktérie rastú v charakteristických karfiolovitých kolóniách alebo vo forme sedimentu alebo blanky v tekutých pödach. Atypické mykobaktérie sa identifikujú podľa typu kolónii, tvorby pigmentu a rýchlosti rastu. Molekulárno-biologickými metódami určujeme prítomnosť DNA/RNA M. tuberculosis komplexu v infekčnej vzorke.

Rezistencia
na bežné ATB a dlhodobá terapia (18 –24 mesiacov 6-9 mesiacov
= rýchlo nastupujúca rezistencia
= používanie kombinácie antimykobakteriálnych chránených prípravkov
INH, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol, streptomycin + cycloserin
(atypické), **chinolóny** (sprievodná infekcie)
1990 mnohočetná rezistencia v USA u HIV

Rýchlorastúce mykobaktérie
– veľmi rezistentné na bežné ATT
- citlivé na aminoglykosidy, cefalosporíny, TTC, chinolóny

M.leprae rýchly nástup rezistencie – kombinácie dapson+rifampicin,
clofazimin+etionamid

Svetová zdravotnícka organizácia (SZO) odporúča presné schémy liekových režimov. V každej krajine sú rešpektované aj národné smernice boja proti TBC, ktorých súčasťou sú aj aktuálne liekové schémy.

Antituberkulotiká sa používajú dlhodobo (3-6 mesiacov) 169 u lepry aj 18 mesiacov. **Rezistencia u Mycobacterium tuberculosis** je spontánna genetická mutácia, ktorá je vo veľkej miere vyvolaná nesprávnym konaním človeka.

Za primárne rezistentné kmene sa považujú tie, ktoré boli izolované zo vzoriek od novodiagnostikovaného jedinca. Ako získaná (sekundárna, akvirovaná) rezistencia sa označujú prípady, keď bol pacient liečený na TBC minimálne 1 mesiac. Primárna rezistencia sa vyskytuje zriedkavejšie. Podľa definícií Svetovej zdravotníckej organizácie (SZO) sú kmene mykobaktérií označované ako: monorezistentné - s rezistenciou na jedno zo základných antituberkulotík, polyrezistentné - s rezistenciou na dve a viac antituberkulotík, multirezistentné (MDR-TB) - s rezistenciou minimálne na isoniazid a rifampicín X-liekovo rezistentné (XDR-TB) - s rezistenciou na isoniazid, rifampicín, fluorochinolóny a minimálne jedno injekčne podávané antituberkulotikum druhej línie (kanamycín, amikacín, kapreomycín), extrémne rezistentné - XXDR-TB - s rezistenciou voči všetkým dostupným antituberkulotikám. Najčastejšie príčiny vzniku MDR-TB a XDR-TB sú: neadekvátny liečebný režim, nesprávne dávkovanie liečiv, nedostatočná kontrola a monitorovanie liečby, prerušované užívanie liekov, skrátenie liečebného režimu, opakované prepuknutie ochorenia, pridružené ochorenia a imunodeficientní pacienti (AIDS, renálna insuficiencia, hepatopatia, malabsorpcia), zlé znášanie terapie, nárast skupín s rizikovými faktormi pre vznik a šírenie TBC (bezdomovci, väzni, drogovovo závislí a pod.).

Hierarchický algoritmus pri vytváraní terapeutických režimov:

1. prvá skupina (izoniazid, rifampicín, pyrazínamid, etambutol),
2. fluorochinolóny (ofloxacín, ciprofloxacín, levofloxacín, moxifloxacín, gatifloxacín),
3. injekčne podávané antituberkulotiká (streptomycín, kanamycín, amikacín, kapreomycín),
4. perorálne antituberkulotiká druhej skupiny (cykloserín, terzidon, etionamid, PAS),
5. tretia skupina alebo experimentálne preparáty (amoksiklav, klaritromicín, klofazidim, linezolid).

Cieľom liečby nie je len vyliečenie chorého na tuberkulózu, ale aj prevencia relapsov choroby a zamedzenie prenosu TBC infekcie na osoby, ktoré boli alebo sú v kontakte s pacientom. Tuberkulóza sa vždy lieči kombináciou antituberkulotík (AT), ktoré majú tri základné vlastnosti zastúpené v rozličnej miere: baktericídnu aktivitu, schopnosť sterilizácie vnútorného prostredia a schopnosť prevencie vzniku rezistencie mykobaktérií. Isoniazid a rifampicín sú najsilnejšími a najúčinnjšími liekmi proti všetkým populáciám *M. tuberculosis*, pyrazínamid je účinný v kyslom prostredí v makrofágoch, streptomycín pôsobí hlavne v extracelulárnom prostredí a etambutol sa používa v kombinácii s predchádzajúcimi antituberkulotikami pri prevencii liekovej rezistencie.

stanovenie ATB citlivosti

- ATT sú rozpustené v médiu, na povrch sa naočkuje testovaný kmeň
- Metóda proporcionálnej citlivosti - dilučná metóda.
Inokulum sa riedi tak, aby sa po kultivácii vytvorilo 100-300 CFU – kolónií tvoriacich jednotiek na platni
- Ak je počet rezistentných kolónií (vyrastú na pôde s ATT) vyšší ako 1% *M. tbc* – terapia bude neúčinná

Zisťovanie citlivosti mykobaktérií na antituberkulotiká sa robí proporčným testom na tuhých alebo tekutých pôdach s konštantnou koncentráciou antituberkulotika. Vyšetrovaný kmeň sa inokuluje v dvoch riedeniach (najčastejšie $10^3 - 10^5$) na pôdy s antituberkulotikom a na kontrolné pôdy. Po 3-týždňovej inkubácii sa vypočíta percento (proporcia) rezistentných kmeňov v testovanej populácii. Kmene, u ktorých na pôde s príslušnou antituberkulóznou látkou vyrástlo 0 – 1% počtu kolónií vyrastených na kontrolnej pôde, sa hodnotia ako citlivé, ostatné ako rezistentné. Keďže klasické metódy kultivácie a testovania citlivosti na antituberkulotiká sú časovo veľmi náročné a výsledky sú často známe až po niekoľkých mesiacoch, hľadajú sa možnosti diagnostiky v moderných, predovšetkým molekulárno-biologických metódach. V súčasnosti sa využívajú na kultiváciu a testovanie citlivosti na antituberkulotiká tekuté kultivačné médiá inkubované v automatických prístrojoch. Tieto automaty sú na základe chemických alebo fyzikálnych zmien v médiu schopné stanoviť prítomnosť mykobaktérií a vyhodnotiť citlivosť na základné antituberkulotiká v priebehu 10 - 14 dní. Molekulárno-biologické metódy skracujú čas potvrdenia prítomnosti patogéna vo vyšetrovanej vzorke, jeho identifikáciu a profil citlivosti na niekoľko hodín. V súčasnosti sa využíva niekoľko známych metód, ktoré sú schopné identifikovať 16 druhov mykobaktérií a

potvrdiť rezistenciu na 2 najdôležitejšie antituberkulotiká - rifampicín a isoniazid - a tým diagnostikovať MDR-TB.

Prevenia

Chemoprofylaxia
INH pri kontakte s M.tbc a pozitívnom kožnom teste,
nežiaduce účinky - hepatotoxicita

Očkovanie
atenuovaný kmeň M. bovis - bacillus Calmette Guerin-BCG - živý kmeň
nežiaduce reakcie - BCG-itída
- pozitívny tuberkulínový kožný test ! **Pozor** na interpretáciu!

Na prevenciu ochorenia je dostupné očkovanie BCG vakcínou. Jeho účinnosť nie je absolútna, ale ochraňuje pred najzávažnejšími formami tuberkulózneho ochorenia v detskom veku a zvyšuje odolnosť proti atakom infekcie pri kontakte s prameňom infekcie. Očkovanie sú novorodenci najskôr 4. deň po narodení. Opakovaná BCG vakcinácia (revakcinácia) je u tuberkulín-negatívnych pacientov po dosiahnutí 10. roku života.

BCG

- Očkovanie proti tuberkulóze
- BCG - Bacillus Calmette - Guérin - očkovanie kmeňom živým atenuovaným kmeňom Mycobacterium bovis - skrížená imunita s Mycobacterium tbc.
- Testovanie bunkovej imunity
 - in vivo kožný tuberkulínový test – Mantoux
 - in vitro

Porovnanie

<ul style="list-style-type: none">• <u>Mantoux: in vivo</u>• reagujú pamäťové bb po BCG aj po M.tbc. stimulácii• aplikácia PPD i.d.• pamäťové bb po BCG alebo M.tbc vycestujú do miesta• zápal s induráciou v mieste vpichu	<ul style="list-style-type: none">• <u>Quantiferon: in vitro</u>• pamäťové bb po M.tbc infekciiv skúmavke + M.tbc = uvoľnenie gama IF↓• ELISA, ELISPOT
---	--

Použitá literatúra:

Kompaníková Jana, Elena Nováková, Martina Neuschlová: Mikrobiológia nielen pre medikov - 2. upravené a doplnené vydanie. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] , [cit. 11. 11. 2020]. <https://portal.jfmed.uniba.sk//clanky.php?id=398>. ISSN 1337-7396.