

# Praktiká ZS 4 Mycobacterium

- Lab. dg mykobaktérií + citlivost' na ATB
- Antituberkulotiká
- Mikroskopia - M.tbc - Ziehl Neelsen,

# Mykobaktérie

**pomaly rastúce**

-Mycobacterium tuberculosis , - Mycobacterium leprae,  
*M.bovis, M.ulcerans*

**-Atypické mykobaktérie – Runyonova klasifikácia I.-IV.**

*M.kansasi, M.marinum*

fotochromatické

*M.scrofulaceum*

skotochromatické

*M.avium, M.intracelulare*

pomaly rastúce nepigmentované

*M.fortuitum, M.chelonae*

rýchlorastúce nepigmentované

## Aktinomycéty a nokardie

# Mycobacterium – rod (genus)

**Bunková stena** bohatá na lipidy = hydrofóbný povrch = rezistentné na dezinfekciu = nepríjímajú farbivo. Ak sa zafarbia odolávajú odfarbeniu aj silným kyselinám = acidorezistentné

## Pomalý rast

Skupina pomaly rastúcich a III.

rozdelia sa každých 12-24 hodín viditeľné kolónie 3-8 týždňov.

Skupina I., II. a IV. - 3 dni a viac

*M. leprae* – nekultivovateľné

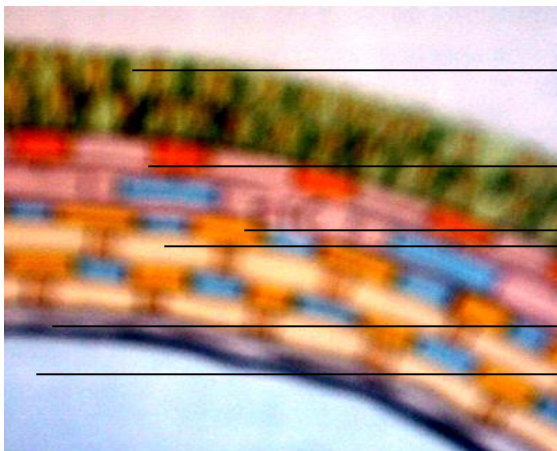
41 druhov (species) z toho 27 izolovaných u ľudí z toho 95% spôsobených *M.tbc*, *M. avium-intracelulare*, *M.kansasii*, *M. foruitum*, *M. chelonae* a *M. leprae*.

## Bunková stena – komplexná

Peptidoglykan (*rigidita 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. – *antigénne vlastnosti, stimulácia bunkovej imunity, extrahovaný a čiastočne purifikovaný sa používa na kožné testy*



Polypeptid PPD

Mykolová kyselina

Arabinoza, galktoza s peptidoglykanom

Cytoplazma s cytoplazmatickou membránou

# Rastové vlastnosti a morfológia kolónií –

**Pomaly rastúce, nepigmentované – M. tbc.....**

**I.skupina – fotochromogénne –**  
produkovujú intenzívne žltý karotenoid na svetle

**II. Skupina – skotochromogénne –**  
produkovujú pigment v tme aj na svetle

**III. skupina - pomaly rastúce nepigmentované**

**IV. skupina - rýchlorastúce nepigmentované**



# Patogenéza a imunita *Mycobacterium tuberculosis*

**Intracelulárny parazit** – unikajú vrodenným imunitným mechanizmom

**Tuberkulóza** – klasické mykobakteriálne ochorenie 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. = mnoholaločné obrovské bunky nahromadených makrofágov „Langhansove bb“)

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

2-4 týždne po infikovaní

**Cytokíny produkované CD4 T lymfocytmi aktivujú makrofágy, ktoré sú schopné zabíjať baktérie:**

*malá antigénna záťaž* – malé tkanivové poškodenie

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

**Obranné mechanizmy:**

- \* cytokíny produkované T lymfocytmi,
- \* aktivácia komplementovej kaskády,
- \* ischemia tkaniva,
- \* hydrolytické enzýmy produkované makrofágmi

**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

# Patogenéza a imunita *Mycobacterium leprae*

Malomocenstvo, Hansenova choroba:

Lepra lepromatózna – silná protilátková odpoveď, defekt bunkovej odpovede na *M.leprae* ako antigén. Veľa baktérií v kožných makrofágoch (Schwannových bb), veľmi infekčná forma

Lepra tuberkuloidná – silná hypersenzitivita neskorého typu, slabá humorálna protilátková odpoveď, množstvo lymfocytov a granulómov, málo baktérií v tkanive (aktivované makrofágy fagocytujú a odstraňujú baktérie)

**Prejavy ochorenia sú spôsobené obrannou reakciou organizmu**

Ostatné mykobaktérie:

*M.kansasí, M avium-intracellulare* granulomatózne: zápal – lokalizovaná pľúcna infekcia, klinicky rovnaká ako tbc., alebo diseminovanú inf.

*M.marinum, M.ulcerans*: kožné infekcie – obľubujú chladnejšiu teplotu

*M.fortuitum, M.chelonae*: veľmi zriedkavo diseminovaná infekcia



## Klinické syndrómy

M.tbc môže postihnúť akýkoľvek orgán

- \* pľúcna
- \* extrapulmonálna tbc
- \* Tbc u HIV infikovaných

M.avium-intracellulare

- \* pľúcne ochorenie (u imunokompromitovaných)
- \* asymptomatická kolonizácia
- \* diseminované ochorenie u HIV pozitívnych

M. leprae

- \* Lepra lepromatózna,
- \* Lepra tuberkuloidná

Ostatné mykobaktoriózy

- \* Pľúcne ochorenie (M.kansasií)
- \* Kožné ochorenie ( )

# Klinické syndrómy

Plúcna tuberkulóza po inhalácii kontaminovaným aerosolom

*Iniciálne plúcne ložisko* – stredný alebo dolný lalok, množenie 3-6 týždňov, kým sa neaktivuje bunková imunita

5% infikovaných – aktívne ochorenie do 2 rokov

5-10% neskôr v živote

Nešpecifické príznaky, málo spúta, rtg obraz plúcnej choroby, pozitívny kožný test, laboratórna verifikácia mikroskopicky a kultivačne.

*Aktívne ochorenie s pneumóniou*, tvorbou abscesu a kavít s rozsiahlym postihnutím horných lalokov.

Extrapulmonálna tbc – hematogénny rozsev počas iniciálnej fázy (uzliny, pleura, UGT) – nemusia byť príznaky plúcneho postihnutia

Tbc u HIV pozitívnych – majú pokles CD4 lymfocytov, vyskytuje sa pred ostatnými príznakmi oportúnnych infekcií



# Laboratórna diagnostika

**Mikroskopia** rýchla dg, Ziehl Neelsen, flueorescencia, príprava vzorky,

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

\* *pomalý rast*

\* prerastenie kontamin.flóry -

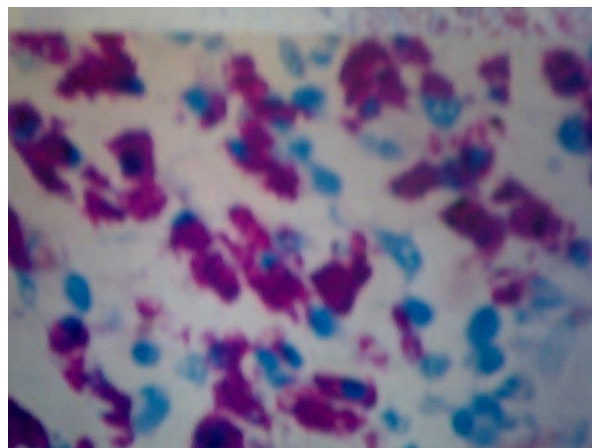
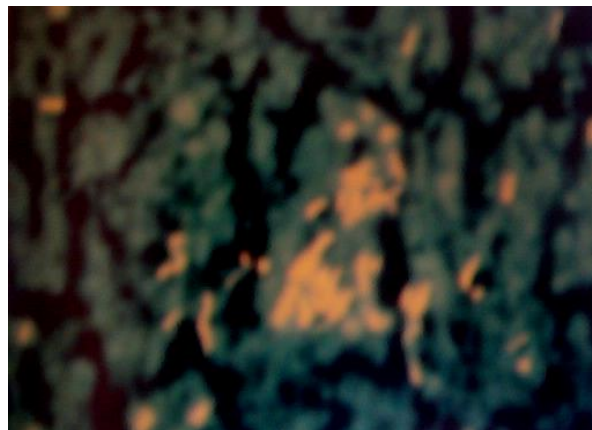
\* *dekontaminácia* NaOH,

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

\* Urýchlenie za použitia detekcie metabolizmu kys.palmitovej a CO<sub>2</sub>

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

**Serológia** necitlivé



# Klinická diagnostika a liečba:

## Kožný test

i.d 0,1 mcg = 5TU aplikácia PPD purifikovaného proteínového derivátu bunkovej steny, po 48 hodinách

<15mm negat – bez reakcie, anergia (aj HIV infikovaní),

**15mm** v poriadku

>15mm kontakt s M.tbc v okolí, ochorenie

**Rezistencia** na bežné ATB, 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 (u nás 1 kmeň na

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

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

# Prevencia

## Chemoprofylaxia

INH 1 rok pri kontakte s M.tbc a pozitívnom kožnom teste hepatotoxicita

## Očkovanie

atenuovaný kmeň M. bovis - bacillus Calmette Guerin–BCG - živý kmeň  
5.deň po narodení, nežiadúce reakcie – BCG-itída – nasleduje pozitívny  
kožný test ! na interpretáciu!

# Epidemiológia – proces šírenia nákazy

*M.tbc*

Ľudia sú jediným prirodzeným rezervoárom

Prenos úzkym dlhodobým kontaktom s chorým inhaláciou

Častice aerosolu s 1-3 tbc bacilmi sa dostanú až do alveolov  
5-200 baktérií môže spôsobiť infekciu.

Zvyšovanie počtu, bezdomovci, AIDS pacienti, alkoholici, narkomani

Rezistencia na antituberkulotiká

Ostatné mykobaktérie

*M. bovis* – infikuje zvieratá, zdroj pre ľudí prostredníctvom mlieka

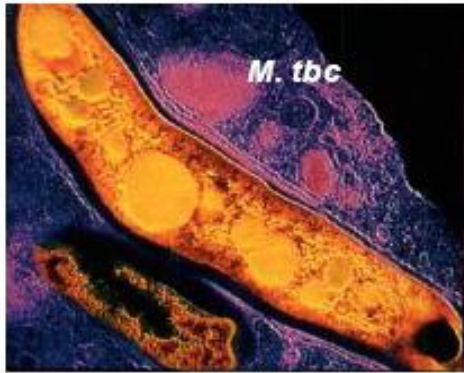
*M.avium-intraellulare complex* – prítomné vo vode a pôde a zvieratách a hydine. Prenos infikovanými potravinami u imonokompromitovaných pacientov AIDS

*M.leprae* 12 miliónov, 62% v Ázii, 34% v Afrike, 10% USA, prenos dlhodobým kontaktom s chorým, inhaláciou, kožným kontaktom so sekrétmi z nosu, exudázmi

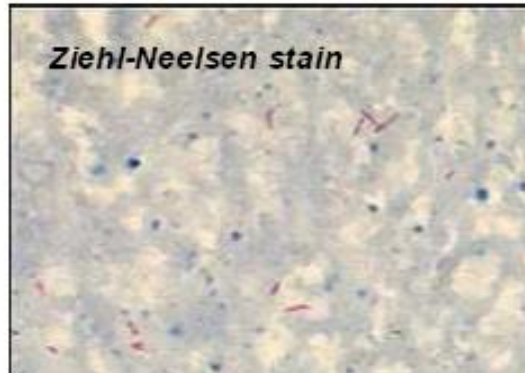
# Lab. dg. mykobaktérií

- Odber materiálu - pľúcna tbc - spútum - ranné spútum, 3 dni za sebou, mimopľúcna - adekvátna vzorka - veľké množstvo tekutiny - moč, menštruačná krv...
- Mikroskopia - Ziehl Neelsen, fluorescencia - zvýšenie citlivosti
- Kultivácia - spracovanie - dekontaminácia sprievodnej flóry, zahustenie vzorky - NaOH, centrifugácia. Vaječné pôdy - Šulova, Lowensteinova / tuhé aj tekuté / - pigment, tvar - karfiolovitá, v zákale, v blanke, v sedimente--- Dlhý generačný čas - urýchlenie - použitie detekcie metabolizmu kys. Palmitovej a CO<sub>2</sub>
- Genetické sondy - dôkaz sekvencie aminokyselín

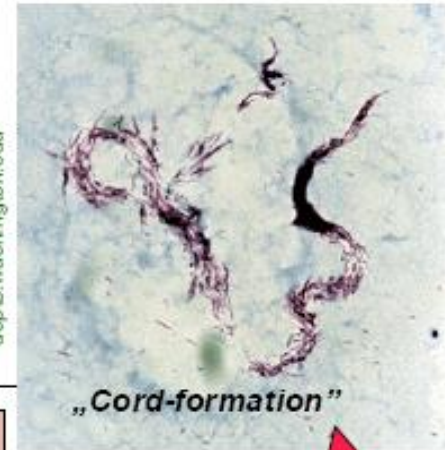




*M. tbc*



Ziehl-Neelsen stain



„Cord-formation”

Gram negative

Gram positive

Complex (acid-fast)



peptidoglycan



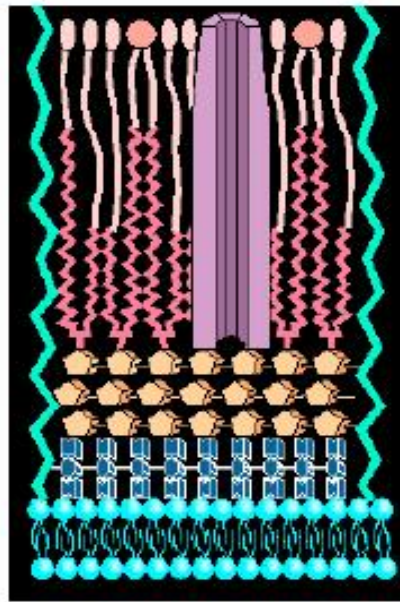
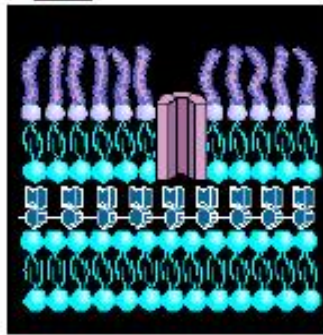
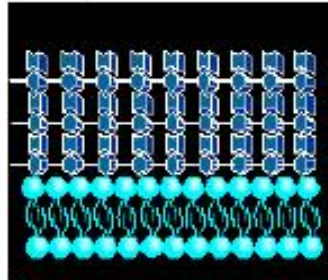
Lipid+LPS



lipid bilayer  
plasma membrane



porins



acyl lipids



**Mycolic acid**  
(*mycolyltrehalose*:  
„cord-factor”)



D-arabinose  
D-galactose

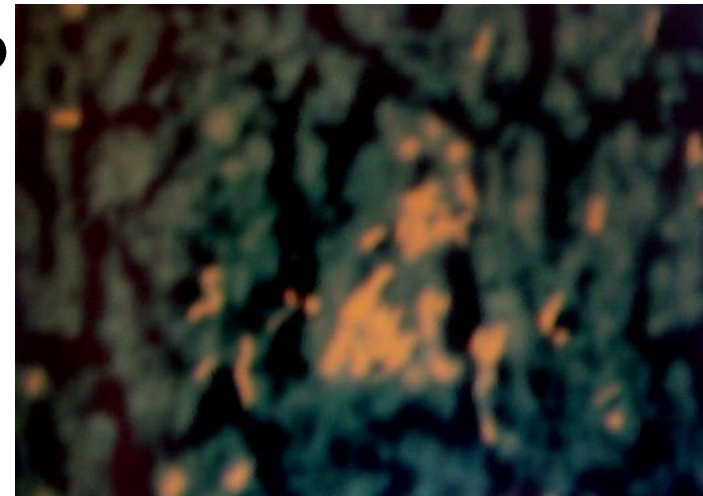


# Farbenie

- Ziehl Neelsen - teplom fixovaný vysušený náter prikryte filtračným papierom. Aplikujte 5-7 kvapiek karbolfuchsínu. Zahrievajte od spodu až do výstupu pár. Odstráňte papier pinzetou, opláchnite vodou a vysušte. Odfarbujte kyslým alkoholom (HCl+etanol) pokiaľ odchádza farba. Dofarbite metylénovou modrou. Opláchnite, vysušte. M. tbc - červené, okolie - slabo modré.

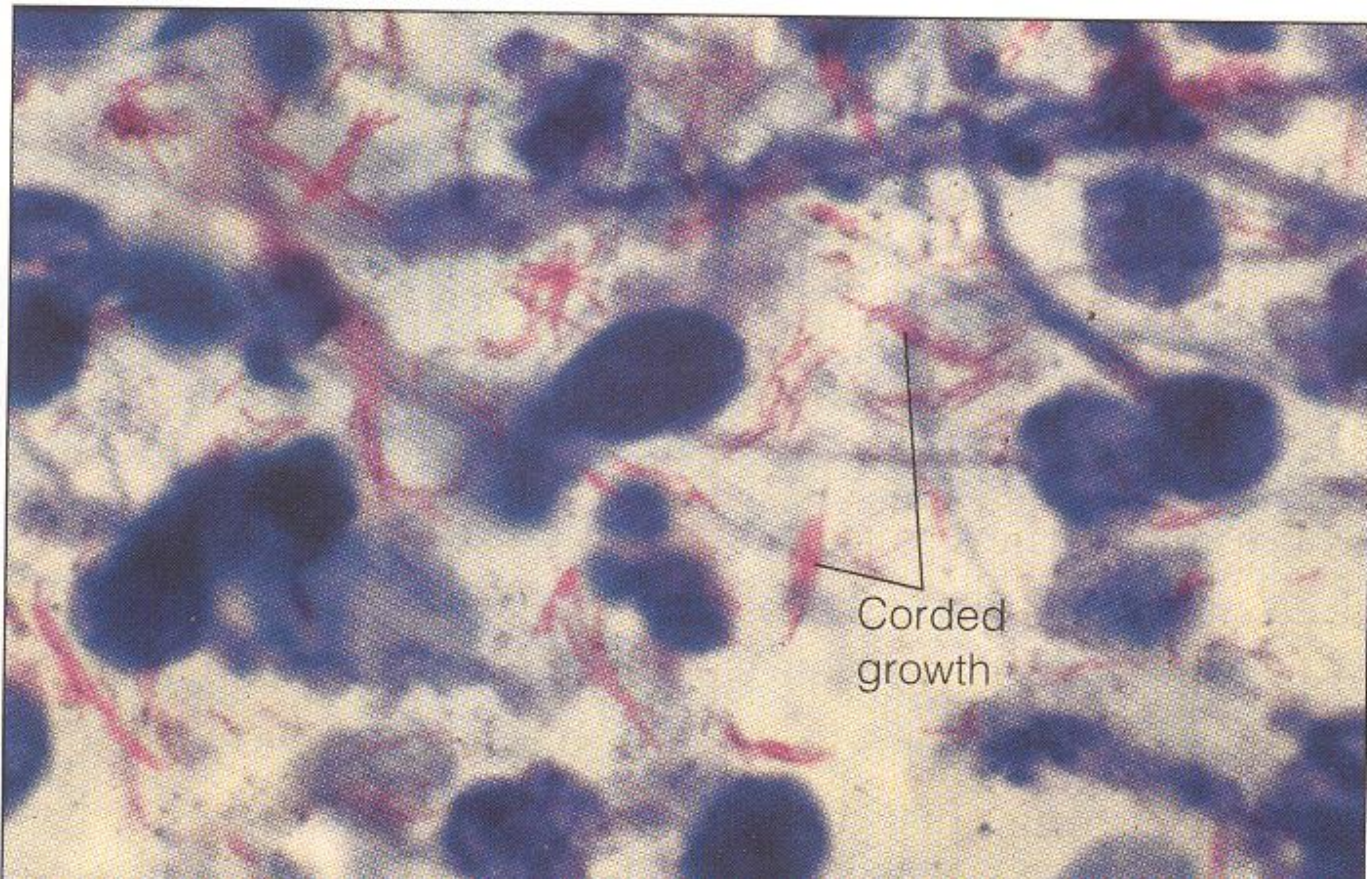
# Fluorescenčný mikroskop

- Používa ortuťovú vákuovú lampu, ktorá emituje svetlo kratších vlnových dĺžok v porovnaní so svetlom používaným v svetelnom mikroskope.
- Využívajú fluorochromy – zlúčeniny schopné absorbovať krátkovlnné ultrafialové alebo ultramodré svetlo a emitovať energiu vyšších vlnových dĺžok. Fluorochromy sa použijú na prípravu preparátu – fluorescenčné farbenie – ktorý po osvetlení krátkovlnným svetlom fluoreskuje
- Vysoká citlivosť – organizmus alebo štruktúra svieti (fluoreskuje) na tmavom pozadí





# Acid-fast bacilli



# Kultivácia M. tbc

- Vaječná pôda - Lowensteinova - karfiolovitý vzhľad, netvorí oigment
- Tekutá pôda - rast v blanku
- kultivácia 3-6 týždňov - odčítavanie každý týždeň

# Antituberkulotiká a liečba

- Streptomycin (zabíja aktívne sa množiace M.tbc)  
Isoniazid, Rifampicin (účinné na M.tbc v kazeózných ložiskách) Ethambutol Etionamid Kanamycin Cycloserin Pyrazinamid ( účinkuje i.c.)
- U pacienta s pľúcnou tbc existujú 3 populácie M.tbc -  
lokalizované extracelulárne v kavite,  
- lokalizované intracelulárne v makrofágoch,  
- lokalizované vo vnútri kazeózneho ložiska
- Kombinácia 2-3 ATT. Oddialenie vzniku rezistencie  
- prerastanie rezistentných mutant - rezistentné mutanty v kultúre M-tbc pre INH  $1:10^5$  pre STM  $1:10^6$  · V ložisku je  $10^7$ -  $10^9$  baktérií

# *Mycobacterium tuberculosis* (cont'd)

- PPD Test (cont'd)  
Positive Test

