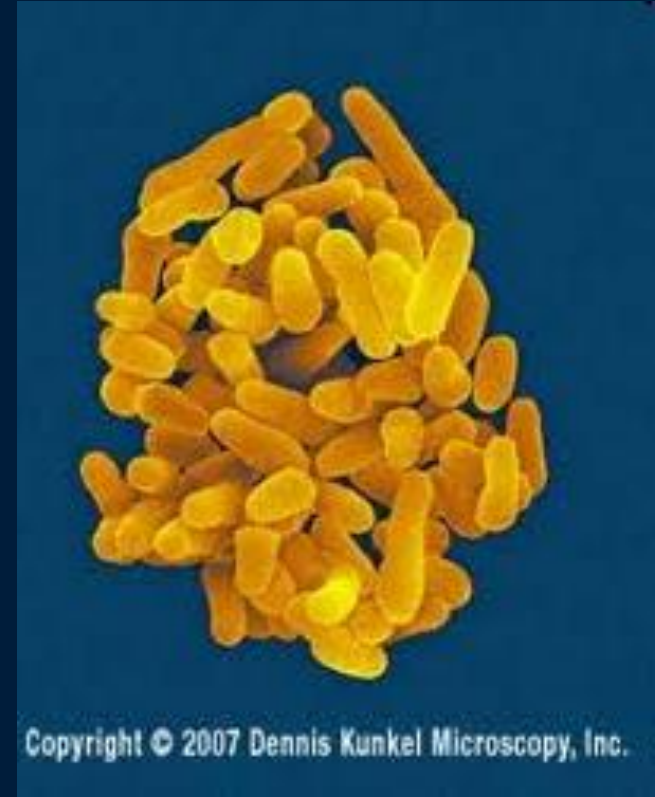
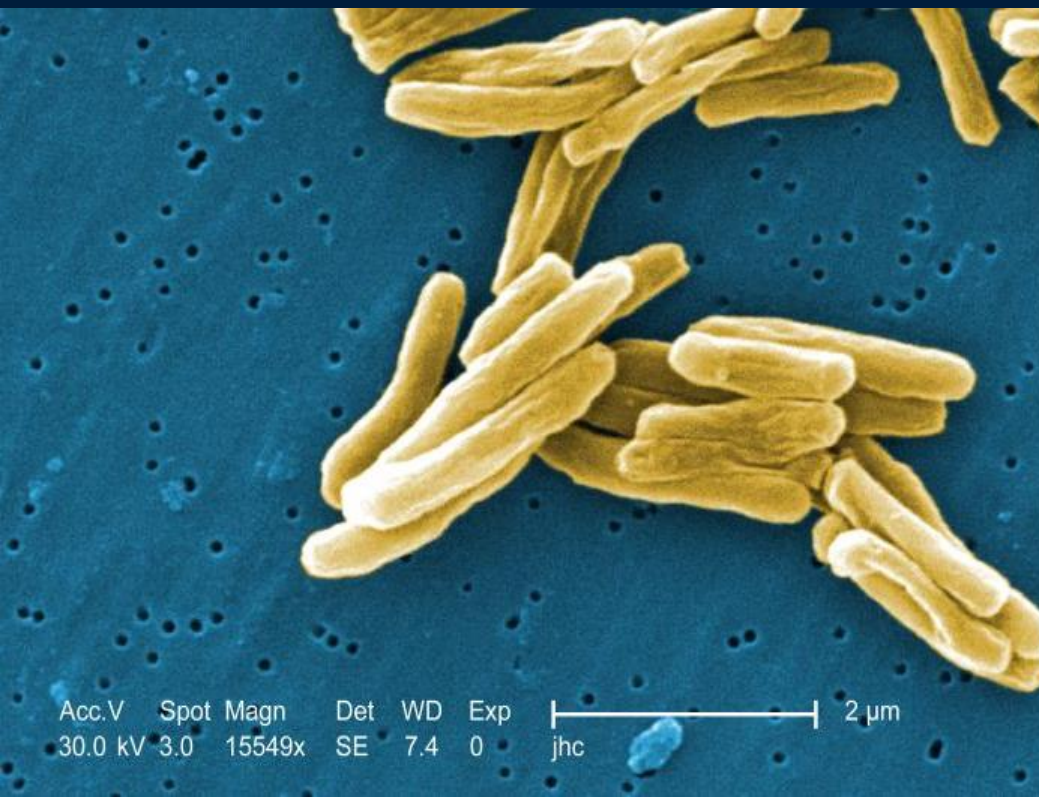


Mycobacterium



Rodzaj *Mycobacterium*

- *Mycobacterium* czyli prątki
- Są szeroko rozpowszechnione w środowisku: występują w wodzie i glebie
- Niektóre gatunki są chorobotwórcze dla człowieka oraz zwierząt

Charakterystyka

- PAŁECZKI PROSTE, LUB LEKKO ZAKRZYWIONE
- BAKTERIE TLENOWE
- WOLNO ROSNĄCE (2-60 DNI)
- NIERUCHOME
- NIE WYTWARZAJĄ PRZETRWAŁNIKÓW
- KWASOOPORNE
- WZGLĘDNIE WEWNĄTRZKOMÓRKOWE (MAKROFAGI)

Cechy charakterystyczne

- Ściana prątków zawiera duże ilości lipidów (~60% suchej masy):

Kwasy mikołowe

Woski

Glikolipidy



- Kwasooporność,
- kwaso-alkoholo-oporność
- hydrofobowość
- odporność na środki dezynfekcyjne
- niewrażliwość na wysychanie
- mechanizmy chorobotwórczości

***Mycobacterium* - podział**

- ***Mycobacterium tuberculosis* complex**
- ***Mycobacterium* other than tuberculosis**
GRUPA MOTT
- ***Mycobacterium leprae***

Mycobacterium tuberculosis complex

PRĄTKI GRUŻLICZE

- *M. tuberculosis*
(prątek gruźlicy ludzkiej)
- *M. bovis*
(prątek bydłący)
- *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Geurin)
- *M. africanum*
(gruźlica ssaków naczelných w Afryce)
- *M. microti*
(prątek mysi)
- *M. canettii*

GRUPA MOTT

- PRĄTKI NIEGRUŻLICZE (ATYPOWE)
- ROZPOWSZECHNIONE W PRZYRODZIE
- W SZCZEGÓLNYCH PRZYPADKACH
POWODUJĄ CHOROBY →

MYKOBAKTARIOZY

(ZAKAŻENIA OPORUNISTYCZE, CZĘSTO PRZEWLEKŁE, DRÓG
ODDECHOWYCH, SKÓRY ORAZ INFЕКCJE ROZSIANE)

GRUPA MOTT

Podział wg Runyon'a

- Podział wg zdolności tworzenia barwnika i szybkości wzrostu
- 4 grupy

Grupa I - fotochromogenne

Wytwarzają barwniki
(żółte lub pomarańczowe karotenoidy) po
ekspozycji na światło

- *M. kansasii*
- *M. marinum*

Grupa II - skotochromogenne

Wytwarzają jasno-żółty barwnik niezależnie od warunków (zarówno w świetle jak i w ciemności)

➤ *M. scrofulaceum*

➤ *M. xenopi*

Grupa III - niechromogenne

Nie wytwarzają barwników

- *M. avium - intracellulare*
- *M. avium*
- *M. ulcerans*
- *M. haemophilum*
- *M. genevense*

Grupa IV - szybkokorosnące

- *M. chelonae*
- *M. fortuitum*
- *M. smegmatis*

Diagnostyka zakażeń

Materiały kliniczne badane w kierunku zakażenia prątkami

GRUŻLICA PŁUC (95% przypadków)

Dorośli:

- **plwocina 2 – 5 ml, 3 próbki w różnych dniach;**
- **wydzielina oskrzelowa,**
- **BAL (popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe).**

Dzieci:

- **popłuczyny żołądkowe**

Materiały kliniczne badane w kierunku zakażenia prątkami

W INNYCH POSTACIACH KLINICZNYCH (materiały skąpoprątkowe)

- mocz 100 – 200 ml (minimum 5 próbek moczu),
- płyn mózgowo – rdzeniowy,
- płyny wysiękowe 20 – 200 ml,
- zawartość węzłów chłonnych,
- wycinki skóry,
- wyskrobiny kości.

Materiały zabiegowe zwykle pojedyncze próbki.

METODY STOSOWANE W DIAGNOSTYCE MYCOBACTERIUM



KONWENCJONALNE



AUTOMATYCZNE



MOLEKULARNE



CHROMATOGRAFICZNE



SEROLOGICZNE

Diagnostyka mikrobiologiczna gruźlicy



BAKTERIOSKOPA – BADANIE MIKROSKOPOWE

(A) METODA ZIEHL-NEELSENA
(B) BARWIENIE FLUORESCENCYJNE



HODOWLA NA PODŁOŻACH

(A) PODŁOŻA KONWENCJONALNE
(B) AUTOMATYCZNE SYSTEMY HODOWLI

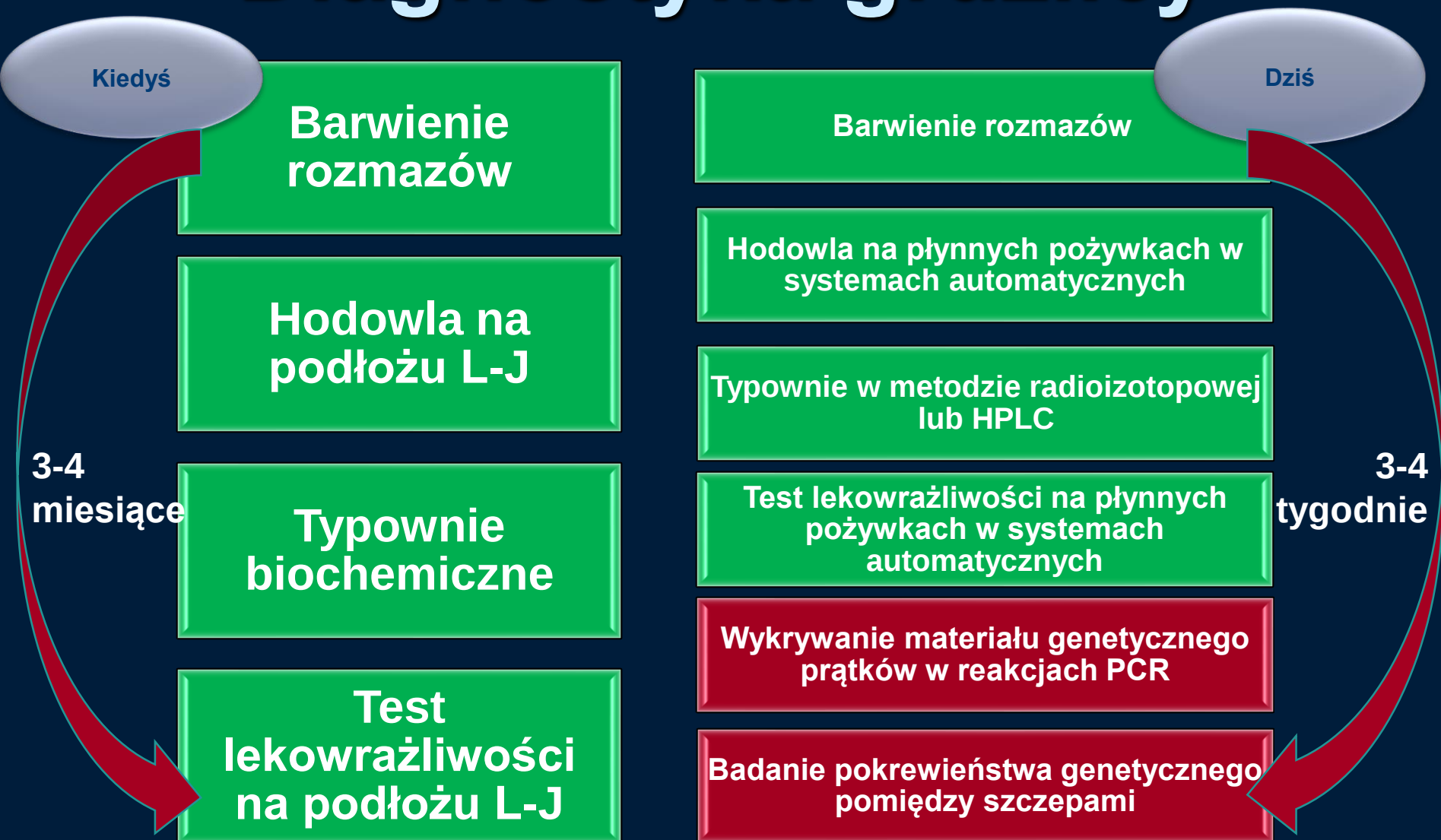


IDENTYFIKACJA PRĄTKÓW



OZNACZENIE LEKOWRAŻLIWOŚCI

Diagnostyka gruźlicy



Czego oczekuje lekarz?

- **Wstępna diagnostyka (bakterioskopia , oznaczenia genetyczne) → wynik do 2 dni**
- **Pełna diagnostyka → wynik do 21 dni**
- **Lekowrażliwość → wynik do 30 dni**

Porównanie czułości metod diagnostycznych

Metoda	Czułość
Bakterioskopia	$\geq 10\ 000$ kom / 1 ml
Hodowla L-J	$\geq 1\ 000$ kom / 1 ml
Nowoczesne systemy hodowli	≥ 500 kom / 1 ml
Metody genetyczne	$\geq 50 - 100$ kom / 1 ml

Barwienie prątków

Barwienie prątków

- Metoda Grama – są gram dodatnie, lecz bardzo słabo barwią się tą metodą
- Metoda Ziehl-Nielsen – prątki są kwaso-alkoholo-oporne
- Barwienie fluorescencyjne

Barwienie prątków

■ Metodą Ziehl – Neelsena

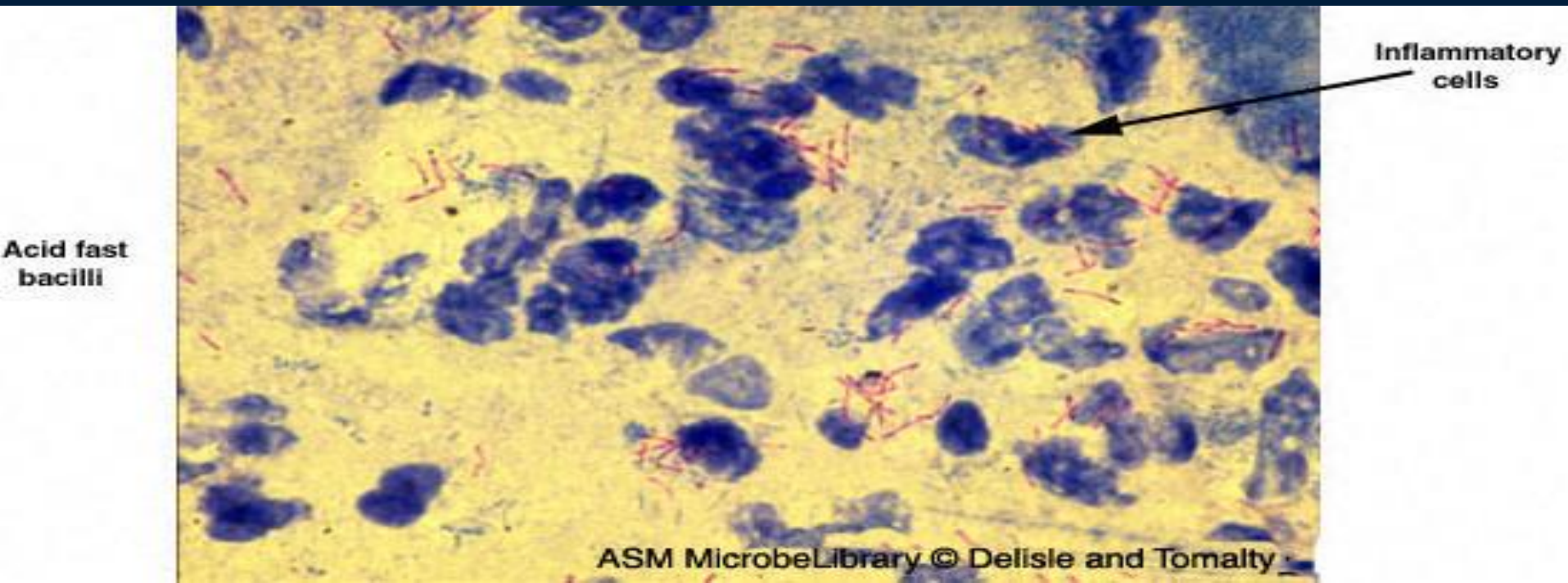


BARWIĄ SIĘ NA
KOLOR
CZERWONY

In order to detect *Mycobacterium tuberculosis* in a sputum sample, an excess of 10,000 organisms per ml of sputum are needed to visualize the bacilli with a 100X microscope objective (1000X mag). One acid-fast bacillus/slide is regarded as "suspicious" of an MTB infection.

Barwienie metodą Ziehl - Neelsena

- barwienie stężoną fuksyną karbolową przy jednoczesnym podgrzewaniu preparatu,
- odbarwianie etanolem zakwaszonym HCl;
- Dobarwienie barwnikiem kontrastowym – błękitem metylenowym
- wynik: **prątki – czerwone**; tło – niebieskie



Interpretacja badania bakterioskopowego

Liczba prątków	Symbol	Interpretacja wyniku
0 w 200 polach widzenia	-	Prątków nie wykryto
1-2 w 200 polach widzenia	+/-	Wynik wątpliwy – badanie powtórzyć
1-9 w 100 polach widzenia	+	Skąpe prątkowanie
1-9 w 10 polach widzenia	++	Obfite prątkowanie
1-9 w każdym polu widzenia	+++	Bardzo obfite prątkowanie
>9 w każdym polu widzenia	++++	Bardzo obfite prątkowanie

Interpretacja badania bakterioskopowego

- **Wynik dodatni** → bardzo dużo prątków w badanym materiale, pacjent obficie prątkujący.

Konieczne badanie genetyczne by wykluczyć obecność prątków środowiskowych!

Badanie bakterioskopowe umożliwia potwierdzenie gruźlicy u ok 50% osób.

- **Wynik ujemny** → brak prątków w obrazie mikroskopowym, nie wyklucza zakażenia, konieczne wykonanie hodowli w celu potwierdzenia/wykluczenia zakażenia.

Barwienie prątków

Metoda FLUORESCENCYJNA

- AURAMINA
- RODAMINA



Representative staining of AFB and background debris with the rapid-AO stain

Barwienie prątków

Metoda Grama

- Barwią się bardzo słabo,
- Gram (+).

Hodowla prątków

Przygotowanie materiału do posiewu



HOMOGENIZACJA

(w celu uwolnienia prątków z ziarniny gruźliczej, śluzu, ropy, elementów tkanek)



DEKONTAMINACJA

(zniszczenie flory towarzyszącej bez uszkodzeń prątków)



ZAGĘSZCZENIE

(prątków przez wirowanie)

Hodowla prątków



KONWENCJONALNE PODŁOŻA



**AUTOMATYCZNE SYSTEMY
HODOWLI PRĄTKÓW**

Hodowla na podłożach konwencjonalnych

- o niezdefiniowanym składzie ze względu na zawartość naturalnych składników,
- 4-10 tygodni inkubacji
- wzrost prątków odczytywany wizualnie

Podłoże Loewensteina -Jensena

Podłoże namnażająco - wybiórcze do hodowli prątków gruźlicy.

Podłoże to ma najczęściej postać skosów w probówce, w swoim składzie zawiera między innymi:

- **asparaginę,**
- **glicerol,**
- **mąkę ziemniaczaną,**
- **jaja kurze.**

Dodatek zieleni malachitowej hamuje wzrost innych bakterii.



Hodowla na podłożach konwencjonalnych



LÖEWEINSTEINA-JENSENA

(z zielenią malachitową, która ogranicza wzrost innych mikroorganizmów)



OGAWY

(glutaminian sodu zamiast asparaginy)



STONEBRINKA

(pirogronian sodu zamiast asparaginy)

Wzrost na podłożach

➤ *M. tuberculosis*

kolonie szorstkie, kalafiorowate,
zlewające się kremowo pigmentowane

➤ *M. bovis*

kolonie małe, gładkie, białło kremowe,
płaskie

➤ *M. avium*

kolonie gładkie, wypukłe,
kremowo lub żółto zabarwione



Colonies of *Mycobacterium tuberculosis* on Lowenstein-Jensen medium. CDC.

Systemy automatyczne

➤ podłoża płynne o zdefiniowanym składzie

(np. podłoże Middlebrooka – zawiera odpowiednie substraty oraz antybiotyki hamujące wzrost flory towarzyszącej oraz wskaźniki namnażania bakterii)

➤ wzrost prątków rejestrowany automatycznie

➤ (zużywanie tlenu, redukcja soli tetrazoliowych, wydzielanie CO₂, zmiana pH pożywki)

➤ Informacja o obecności prątków już w czasie 5-12 dni od założenia hodowli.

AUTOMATYCZNE SYSTEMY KONTROLI PRĄTKÓW

- **FLUORESCENCYJNA:** Bactec MGIT 960 (zużywanie tlenu w pożywce wyzwała reakcję fluorescencyjną)
- **RADIOMETRYCZNA:** Bactec 460 Tb (system izotopowy – kwas palmitynowy znakowany węglem $C^{14} \rightarrow CO_2$) zwłaszcza przy materiałach skąpo-prątkowych
- Zmiana pH (MB/BacT)
- Redukcja soli tetrazoliowych zawartych w podłożu (MB Redox)

Met. fluorescencejna

A Commitment to Safety & Performance

The BACTEC MGIT 960 System was designed to meet the needs of TB laboratories and has been reported as the system with equivalent performance to the BD BACTEC 460TB System.^{1,2}

- **Plastic tubes enhance safety**

The BD BACTEC MGIT 960 System accentuates operator safety with plastic tubes, no sharps and no need to handle or transfer tubes once the system is loaded.

- **Fully automated testing**

Identifies positives as they occur – often at a faster rate than other instrumented systems.^{2,3,4} Faster results can improve patient care and lower health care costs by reducing hospital stays and optimizing equipment and staff utilization.



Met. radiometryczna



The BACTEC 460TB System was the first automated system for mycobacteria testing. Today, the BACTEC 460TB System still serves as the benchmark for quality, reliability and performance.

Identyfikacja prątków

Identyfikacja prątków



TEMPO WZROSTU
(*M. tuberculosis* – do 10 tyg.,
MOTT – 2 tygodnie)



WYTWARZANIE BARWNIKÓW (MOTT)
SZCZEPY FOTOCHROMOGENNE wytwarzają barwniki po
ekspozycji na światło,
SZCZEPY SKOTOCHROMOGENNE wytwarzają jasnożółty barwnik
niezależnie od warunków,
NIEFOTOCHROMOGENNE – nie wytwarzają wcale barwników

Identyfikacja prątków



CECHY BIOCHEMICZNE

(np. wytwarzanie niacyny, tworzenie katalazy, redukcja azotanów, tworzenie kwaśnej fosfatazy, aktywność ureazowa, tolerancja 5% NaCl i in.)



WYGLĄD KOLONII

METODY STOSOWANE W DIAGNOSTYCE *MYCOBACTERIUM*



MOLEKULARNE

-SONDY GENETYCZNE

-TESTY OPARTE NA REAKCJI AMPLIFIKACJI

SEKWENCJI NUKLEOTYDOWYCH DNA LUB RNA



CHROMATOGRAFICZNE

w oparciu o różnice w składzie jakościowym i ilościowym kwasów mikołowych zawartych w komórkach

-WYSOKOCIŚNIENIOWA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA (HPLC)

- CHROMATOGRAFIA CIEŃKOWARSTWOWA (TLC)

METODY STOSOWANE W DIAGNOSTYCE *MYCOBACTERIUM*



METODY SEROLOGICZNE

wykrywanie w surowicy przeciwciał IgG
przeciw antygenom prątków

**-AGLUTYNACJA LATEKSU OPŁASZCZONEGO
ODPOWIEDNIM ANTYGENEM PRĄTKOWYM**

-METODA RADIOIMMUNOLOGICZNA

-METODA IMMUNOENZYMATYCZNA

Do oznaczeń stosuje się antygen A60 charakterystyczny
dla całego rodzaju *Mycobacterium*

Rozpoznanie zakażenia prątkiem gruźlicy



Odczyn tuberkulinowy

Tuberkulina – wyciąg białkowy z zabitej hodowli prątków, zawiera antygeny występujące krzyżowo u *Mycobacterium tuberculosis* complex (w tym również *M. bovis* BCG – szczepu szczepionkowego) i u prątków środowiskowych MOTT.



Testy IGRA: Quantiferon TB Gold, T-SPOT. TB

Zasada działania:

→ pomiar IFN-gamma wydzielanego przez swoiste limfocyty T stymulowane przez antygeny (ESAT 6; CFP 10; Tb 7,7) specyficzne dla *M. tuberculosis* (które nie występują w szczepie szczepionkowym).

Odczyn tuberkulinowy

- Szczególnie skuteczny do rozpoznania zakażenia w populacji nie szczepionej BCG.
- Wykrywa nadwrażliwość typu opóźnionego na białkowe powierzchniowe antygeny prątka – tuberkulinę
- Powstaje u osób uczulonych na antygeny prątków w miejscu śródskórnego wstrzyknięcia tuberkuliny (mieszanina ag wszystkich MTC).
- Naciek powstaje u osób posiadających komórki układu odpornościowego uczulone na ag zawarte w tuberkulinie.
- Zawsze należy wykonać u pacjentów z HIV

Testy IGRA (wydzielania interferonu gamma)

- Obecnie stosuje się **testy IGRA z krwi obwodowej**, umożliwiające szybką diagnostykę **latentnego zakażenia *M. tuberculosis***, poprzez pomiar interferonu gamma wydzielanego przez limfocyty T pobudzone antygenami swoistymi dla *Mycobacterium tuberculosis*.
- Wykrywanie latentnego zakażenia ma istotne znaczenie w kontroli osób potencjalnie zagrożonych zachorowaniem na gruźlicę, na przykład przebywających w bliskim kontakcie z chorymi prątkującymi oraz dla pacjentów kwalifikowanych do leczenia lekami biologicznymi.

WG. WHO ZA PRZYPADEK GRUŻLICY
UWAŻA SIĘ WYNIK

POTWIERDZONY BAKTERIOLOGICZNIE

(WYHODOWANIE PRĄTKÓW Z MATERIAŁU
KLINICZNEGO JEST NAJBARDZIEJ
OBIEKTYWNYM DOWODEM TOCZĄCEGO
SIĘ PROCESU CHOROBOWEGO)

METODY SEROLOGICZNE,
MOLEKULARNE I CHROMATOGRAFICZNE
MUSZĄ BYĆ POTWIERDZONE PRZEZ
METODY HODOWLANE

Oznaczenie lekowrażliwości

OZNACZENIE WRAŻLIWOŚCI NA ANTYBIOTYKI (TUBERKULOSTATYKI)

METODĄ STĘŻENIOWĄ

Kontrola ujemna – inkubacja samego podłoża (sprawdza się jego jałowość)

Kontrola dodatnia – posiew prątków w kilku rozcieńczeniach (sprawdza się jakość podłoża)

LEKI PIERWSZEGO RZUTU

(terapia kombinowana czterolekowa w celu opóźnienia rozwoju oporności),
inkorporowane bezpośrednio do podłoża w określonych stężeniach:

IZONIAZYD (INH)*

RYFAMPICYNA (RMP)*

PIRAZYNAMID (PZA)

ETAMBUTOL (EMB, ETB)

lub STREPTOMYCYNA (SM)

W trakcie leczenia – regularne sprawdzanie wrażliwości na stosowane antybiotyki
(zmiana terapii w razie wykrycia oporności).

LEKI P/PRĄTKOWE **DRUGIEGO RZUTU**

cykloseryna

etionamid

fluorochinolony

kanamycyna

kwask para-aminosalicylowy PAS

ryfabutyna

wiomycyna

pełna diagnostyka 10 – 12 tygodni

Schematy leczenia p/prątkowego

Kategoria chorych	Leczenie intensywne	Faza kontynuacji
<u>Pierwsze leczenie</u> (nowy przypadek, niezależnie od lokalizacji)	2 miesiące (4 leki): IZONIAZYD (INH), RYFAMPICYNA (RMP) PIRAZYNAMID (PZA) ETAMBUTOL (EMB) lub STREPTOMYCYN (SM)	4 miesiące (2 leki): IZONIAZYD (INH), RYFAMPICYNA (RMP)
<u>Kolejne leczenie</u> (wznowa gruźlicy, leczenie po przerwie)	2 miesiące: INH, RMP, PZA, EMB, SM plus 1 miesiąc: INH, RMP, PZA, EMB (po ozn lekowrażliwości kontynuacja leczenia wg wyniku)	5 miesięcy: INH, RMP, EMB

Definicje lekooporności

Typ lekooporności <i>M. tuberculosis</i>	Definicja
Lekooporność pierwotna	Oporność prątków na leki przeciwprątkowe przed rozpoczęciem leczenia
Lekooporność nabyta	Oporność prątków na jeden lub więcej leków, która powstała w trakcie leczenia
Lekooporność na jeden lek	Oporność pierwotna lub nabyta na jakikolwiek jeden lek
Lekooporność poli-lekowa	Oporność pierwotna lub nabyta na więcej niż jeden lek, ale ze wzorami innymi niż MDR
Lekooporność całkowita	Oporność na leki będąca sumą oporności wszystkich wzorów oporności
Lekooporność MDR	Oporność na INH + RMP, także w połączeniu z opornością na inne leki
Lekooporność XDR	Oporność MDR + oporność na fluorochinolon + amikacynę, kanamycynę lub kapreomycynę

OPORNOŚĆ

MDR-TB (Multi Drug Resistant)

oporność jednocześnie na dwa leki
przeciwprątkowe: izoniazyd i ryfampicynę

XDR-TB (Extremely Drug Resistant)

oporność jednocześnie na izoniazyd i ryfampicynę
oraz co najmniej jeden fluorochinolon i co najmniej
jeden lek podawany we wstrzyknięciach
(aminoglikozyd, kapreomycyna).

LEKOWRAŻLIWOŚĆ MTBC oraz MOTT

PODSTAWOWA - na 4 leki (podłoże L-J)

SM /czerwony kolor korka/ -streptomycyna	I 4 µg /ml	II 8 µg /ml
INH /żółty kolor korka/ -izoniazyd	I 0,2µg /ml	II 0,4µg /ml
ETB /biały kolor korka/-etambutol	I 2µg/ml	II 4 µg /ml
RMP /czarny kolor korka/ -rifampicyna	I 40µg /ml	II 80µg/ml

ROZSZERZONA

ETA, OFL – podłoże L-J

ETA I /korek szary/ - etionamid	I 40µg/ml
ETA II /korek brązowy/- etionamid	II 80µg/ml
OFL I /korek niebieski/ - ofloksacyna	I 2,5µg/ml
OFL II /korek fioletowy/ - ofloksacyna	II 5µg/ml

A, D, B – podłoże Middlebrooka

A /zielony kolor korka/- amikacyna	I 4µg/ml	II 8µg/ml
	III 16 µg/ml	
B /niebieski kolor korka/ - biseptol	I 4µg/ml	II 8µg/ml
	III 16µg/ml	IV 32µg/ml
D /różowy kolor korka/ - davercin	I 4µg/ml	II 8µg/ml
	III 16µg/ml	

Do każdej lekowrażliwości 3 podłoża bez leku - kontrolne

M - podłoże posiane zawiesiną macierzystą 0,5 Mc Farlanda

I - podłoże posiane zawiesiną kontrolną 1:100

R - podłoże posiane zawiesiną roboczą 1:20 (posiewaną na podłoża z lekami)

K – podłoże Middlebrooka – kontrola wzrostu posiana zawiesiną roboczą

Podłoże Wagnera-Mitscherlicha

Prątki ludzkie rozkładają glicerol dodany do podłoża i powodują zmianę barwy podłoża ze **stalowo-niebieskiej** na **szaro-zieloną**.

Prątki bydlęce oraz atypowe MOTT nie rozkładają glicerolu i nie zmieniają barwy podłoża.

**Krajowe Referencyjne
Laboratorium Prątki
Instytut Gruźlicy i
Chorób Płuc**

**ul. Płocka 26
01-138 Warszawa**