

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

***Mycobacterium tuberculosis* jako původce
závažného onemocnění**

Bc. TOMÁŠ HAMPL

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej JANĎOUREK, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2021

Poděkování

Chtěl bych poděkovat PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, za velmi cenné rady a poznámky, také za velmi vstřícný přístup a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Janě Vackové za pomoc a rady v laboratoři při experimentální části. Poděkování za poskytnutí testovaných sloučenin patří MSc. Darie Nawrot a PharmDr. Martinu Juhásovi z výzkumné skupiny prof. PharmDr. Martina Doležala, Ph.D. z katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy. V neposlední řadě patří obrovské poděkování mé rodině, která mě podporovala nejen při psaní této diplomové práce, ale i po celou dobu studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové,

.....
Bc. Tomáš Hampel

OBSAH

1	ABSTRAKT	6
2	ABSTRACT	7
3	ÚVOD.....	8
4	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	9
5	TEORETICKÁ ČÁST	10
5.1	Rod <i>Mycobacterium</i>	10
5.1.1	Morfologie	10
5.1.2	Genom.....	12
5.1.3	Fyziologie a kultivace	13
5.1.4	Patogenita a rozdělení	14
5.2	Tuberkulóza.....	16
5.2.1	Původce <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
5.2.2	Patogeneze a imunita	18
5.2.3	Klinické příznaky.....	24
5.2.4	Epidemiologie.....	24
5.2.5	Klinická diagnostika	30
5.2.6	Laboratorní diagnostika	33
5.2.7	Terapie	44
5.2.8	Prevence a kontrola.....	48
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	51
6.1	Použité laboratorní chemikálie, materiál a přístroje.....	51
6.1.1	Chemikálie.....	51
6.1.2	Materiál.....	51
6.1.3	Přístroje.....	52
6.2	Postup testování.....	52
6.2.1	Příprava látek	52
6.2.2	Příprava roztoků v bujónu.....	52
6.2.3	Příprava destičky.....	53
6.2.4	Pipetování látek.....	53
6.2.5	Příprava suspenze.....	53
6.2.6	Inkubace.....	54
6.2.7	Vyhodnocení.....	55
6.3	Testovací kmeny	57

6.3.1	<i>M. smegmatis</i>	57
6.3.2	<i>M. aurum</i>	57
6.3.3	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	58
6.4	Standardy.....	59
6.5	Testované látky	60
7	VÝSLEDKY	71
8	DISKUSE	76
9	ZÁVĚR	85
10	POUŽITÉ ZKRATKY	87
11	SEZNAM OBRÁZKŮ	91
12	SEZNAM TABULEK	92
13	SEZNAM GRAFŮ	92
14	POUŽITÁ LITERATURA	93

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Autor: Bc. Tomáš Hampl

Školitel: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Název diplomové práce: *Mycobacterium tuberculosis* jako původce závažného onemocnění

Tato diplomová práce má v teoretické části za cíl věnovat se tuberkulóze, popsat původce onemocnění, taxonomické zařazení do systému, popsat vznik, průběh a klinické projevy onemocnění, diagnostiku, včetně laboratorní diagnostiky, epidemiologii tuberkulózy, možnosti terapie a prevence.

Tuberkulóza (TBC) je jednou z nejsmrtelnějších infekčních onemocnění na světě, které je u člověka způsobeno bakterií *M. tuberculosis*. TBC je někdy vnímaná jako nemoc minulosti, avšak nedávný nárůst případů nemoci, a především rozšíření forem TBC odolných vůči používaným lékům, činí tuto nemoc velmi nebezpečnou. V současnosti je velkým problémem alarmující nárůst rezistentní a multirezistentní tuberkulózy, proti kterým neúčinkují běžně používané léky první linie. Proto je ve světě neustále kladen důraz na objevování a zkoušení nových potenciálních antituberkulotik, které by mohly pomoci pacientům s rezistentní a multirezistentní TBC.

V experimentální části se práce zabývá testováním antimykobakteriální aktivity potenciálních antituberkulotik na kmenech rodu *Mycobacterium* (*M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. tuberculosis*) pomocí mikrodiluční bujónové metody, vyhodnocením získaných výsledků a jejich interpretaci z hlediska vztahu účinnosti a struktury testovaných sloučenin.

Součástí této práce bylo testování celkem 81 potenciálních antituberkulotik ve 3 sériích. Jako nejúčinnější potencionální antituberkulotika se jevily látky s označením 6, 69, APC-AT, APC-AT-3Me, APC-AT-Adam. Těmto látkám by k potvrzení účinnosti měla být ve výzkumu dále určitě věnována pozornost a mělo by být provedeno rozsáhlejší testování.

Klíčová slova: mykobakterie, tuberkulóza, antituberkulotika, mikrodiluční bujónová metoda, minimální inhibiční koncentrace

2 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové

Field of study: Specialist in laboratory methods

Author: Bc. Tomáš Hampl

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Title of diploma thesis: *Mycobacterium tuberculosis* as causative agent of grave illness

The aim of this diploma thesis is to deal with tuberculosis, describe the pathogen, taxonomic classification, describe the origin, course and clinical manifestations of the disease, diagnosis, including laboratory diagnostics, epidemiology of tuberculosis, treatment and prevention.

Tuberculosis (TBC) is one of the deadliest infectious diseases in the world caused by bacterium *M. tuberculosis* in humans. TBC is sometimes referred as a disease of the past, but the recent rise in cases of the disease, and especially the spread of forms of drug-resistant TBC, makes the disease very dangerous. Currently, a major problem is the alarming rise in resistant and multi-resistant tuberculosis, which is not counteracted by commonly used first-line drugs. Therefore, there is a constant emphasis around the world on discovering and testing new potential antitubercotics that could help patients with resistant and multidrug-resistant TBC.

In the experimental part, the thesis deals with screening of antimycobacterial activity of potential antitubercotics against strains of the genus *Mycobacterium* (*M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. tuberculosis*) using a microdilution broth method, evaluation of the obtained results and their interpretation in order to determine relationship between activity and structure of tested compounds.

Part of this work was focused on screening of 81 potential antitubercotics in 3 series. The most effective antitubercotics appeared to be 6, 69, APC-AT, APC-AT-3Me, APC-AT-Adam. These substances should certainly be given further attention in research to confirm their effectiveness, and more extensive testing should be carried out.

Keywords: mycobacteria, tuberculosis, antitubercotics, microdilution broth method, minimum inhibition concentration

3 ÚVOD

Tuberkulóza (TBC) je multisystémové infekční onemocnění způsobené u člověka především bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Toto onemocnění mohou způsobovat také *M. bovis* (původce u hovězího dobytka), *M. microti* (původce u hrabošů) a *M. africanum*. Všechny mykobakterie jsou acidorezistentní, dlouhé, štíhlé, nesporeující a nepohyblivé tyčinky. (Greenwood, 1999; Harvey, 2007)

TBC je dlouhodobě celosvětově nejběžnější příčinou úmrtí na infekční onemocnění. Podle Světové zdravotnické organizace WHO (*World Health Organization*) každý rok tuberkulózou onemocní asi 10 miliónů lidí. Na tuberkulózu ročně umírá 1,4 miliónu lidí. Infekce TBC spojené s HIV (z angl. *Human Immunodeficiency Virus*) jsou hlavní příčinou úmrtí pacientů s HIV. Většina lidí, kteří onemocní TBC, žije v rozvojových zemích a v zemích tzv. třetího světa, avšak TBC je přítomna po celém světě. Odhaduje se, že asi čtvrtina světové populace je infikována *Mycobacterium tuberculosis*. Pouze 5-15 % těchto lidí onemocní aktivní formou TBC. (WHO, 2020)

TBC pravděpodobně infikovala člověka po mnoho staletí. Důkazy o tuberkulózních infekcích byly nalezeny u mrtvol, jejichž původ je datován přibližně 8000-7000 let př. n. l. Řekové onemocnění označovali jako tzv. ftízu. Odhaduje se, že v mnoha evropských zemích způsobila TBC smrt asi u 25 % dospělých. Robert Koch objevil příčinu TBC, *Mycobacterium tuberculosis*, v roce 1882, za což v roce 1905 získal Nobelovu cenu.

Se zvýšením povědomí o TBC, iniciativám v oblasti veřejného zdraví, vhodnými léčebnými metodami, jako je izolace pacientů, a vývojem léků na léčbu TBC, byl výskyt onemocnění, zejména v rozvinutých zemích, výrazně snížen. V současnosti je velkým problémem nedávný nárůst případů nemoci a nárůst rezistentních a multirezistentních forem tuberkulózy (Davis, 2021)

4 ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce je zpracovat publikované informace o tuberkulóze. Popsat, charakterizovat a klasifikovat původce (*M. tuberculosis*), vznik, průběh, epidemiologii a klinické příznaky onemocnění. Dále se zaměřit na diagnostiku onemocnění, možnosti terapie a prevence.

V experimentální části je cílem testování antimykobakteriální aktivity potenciálních antituberkulotik na kmenech rodu *Mycobacterium* (*M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. tuberculosis*) pomocí mikrodiluční bujónové metody na základě standardů CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) a EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) s mírnými úpravami, vyhodnocení získaných výsledků a jejich interpretace z hlediska vztahu účinnosti a struktury testovaných sloučenin.

5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Rod *Mycobacterium*

Název rodu je odvozen od řeckých slov *mykes* (plísně) a *bacterion* (tyčinka), které růstem a vzhledem svých kolonií mykobakterie připomínají. Taxonomicky se řadí do oddělení *Actinobacteria*, řádu *Actinomycetales*, čeledi *Mycobacteriaceae* a rodu *Mycobacterium*. Na základě analýzy jejich genomu se nedávno od tohoto rodu odčlenilo několik druhů, které se zařadily do třech nových rodů, *Mycobacteroides*, *Mycolibacter* a *Mycolicibacterium*. (Liptáková, 2019)

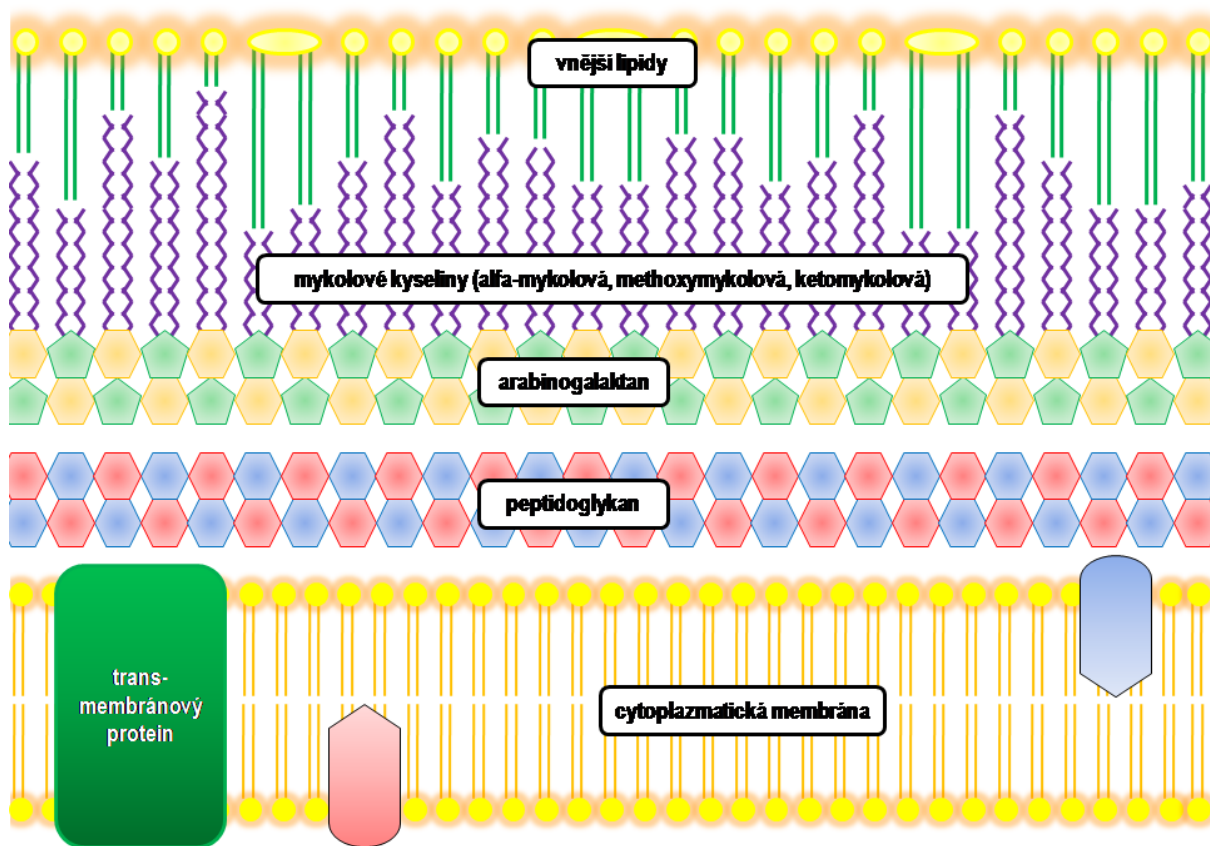
Do rodu *Mycobacterium* patří bakterie, které mají neobvyklé vlastnosti morfologické (nelze je obarvit běžně používaným barvicím postupem dle Grama), patogenní (spadají sem původci tuberkulózy a lepry, což jsou chronické infekce a v jejich patogenезi hraje značnou roli reakce makroorganismu a buněčná imunita), kultivační (většina roste i na speciálních půdách velice pomalu) a terapeutické (jsou citlivé na jiný typ antimikrobiálních látek než ostatní bakterie). Podle vyššího obsahu guaninu a cytosinu ve své DNA jsou příbuzné k bakteriálním rodům *Corynebacterium* a *Nocardia*. (Votava, 2003)

Zhruba 50 druhů mykobakterií se dělí do dvou hlavních skupin, rychle a pomalu rostoucích. Pomalý růst je relativní vzhledem k době růstu ostatních bakterií. Vyskytují se v půdě a ve vodě, kde žijí převážně saprofytický, ale uplatňují se i jako oportunní patogeny zvířat a člověka. Některé jsou primárními patogeny člověka. Příbuzné druhy jsou zařazovány do komplexů, jako například tuberkulózní mykobakterie *M. tuberculosis* komplexu. Do této skupiny patří *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canettii* a *M. pinnipedii*. Skupina netuberkulózních mykobakterií zahrnuje více druhů, které jsou potenciálně patogenní pro člověka nebo žijí saprofytický. (Greenwood, 1999; Liptáková, 2019)

5.1.1 Morfologie

Mykobakterie jsou dlouhé, štíhlé a nepohyblivé tyčinky, které tvoří spory. Buněčná stěna mykobakterií je neobvyklá v tom, že obsahuje asi z 60 % lipidy, včetně jedinečné třídy sloučenin s velmi dlouhými a větvenými řetězci (60 až 90 atomů uhlíku), řazené mezi β -hydroxylované mastné kyseliny (mykolové kyseliny). Jedná se o komplex s řadou polysacharidů a peptidů, které vytvářejí voskovitý buněčný povrch, díky kterému jsou mykobakterie silně hydrofobní, a jsou zodpovědné i za jejich barvitelnost. (Harvey, 2007)

Základní struktura buněčné stěny (obr. 1) je typická pro grampozitivní bakterie. Vnitřní plazmatická membrána je překrytá silnou peptidoglykanovou vrstvou a vnější membrána přítomna není. Struktura buněčné stěny mykobakterií je však mnohem složitější než u jiných grampozitivních bakterií. V plazmatické membráně jsou ukotveny proteiny, fosfatidylinositol manosidy (PIM), lipomanan (LM) a lipoarabinomanan (LAM), který je funkčně příbuzný s O-antigenními lipopolysacharidy přítomnými u jiných bakterií. Dále jsou také přítomny lipidy, glykolipidy a peptidoglykolipidy. Velice významný povrchový glykolipid buněčné stěny mykobakterií je *cord factor*, který je zodpovědný za jejich virulenci. Ve vrstvách buněčné stěny se nachází i transportní proteiny a poriny, které tvoří 15 % hmotnosti buněčné stěny. Proteiny jsou velice důležité antigeny, které stimulují buněčnou imunitní odpověď pacienta. (Murray, 2012)



Obrázek 1 Složení buněčné stěny mykobakterií

Na obrázku je schéma struktury buněčné stěny mykobakterií. Vidíme cytoplazmatickou membránu s transportními proteiny, peptidoglykan, arabinogalaktan, mykolové kyseliny a vnější lipidy.

zdroj: <http://mikrobiologie.xf.cz/files/atb-bunecna-stena.doc.html>

Tuberkulin je nejznámější antigen připravený již Kochem. Původní preparát označovaný jako starý tuberkulin se získával zahuštěním tekuté půdy po oddělení bakteriální masy. Tuberkulin označovaný jako PPD (z angl. *purified protein derivatives*) se získává vysrážením proteinového komplexu z filtrátu mykobakteriální kultury zdokonalenou technikou. Extrakt těchto proteinových derivátů zvaný PPD nahradil původní Kochův tuberkulin a slouží ke kožnímu zjišťování pozdní přecitlivělosti na mykobakteriální antigeny, kdy se nejčastěji aplikuje intradermálně (Mantoux test). U zdravých neinfikovaných jedinců nevyvolává reakci, zatímco u osob infikovaných nebo vakcinovaných dochází po 48-72 hodinách v místě vpichu k vzniku zánětlivého infiltrátu. (Bednář, 1996; Votava, 2003)

Vhledem k této složité struktuře buněčné stěny je nelze obarvit dle Grama, pokud se užije běžného postupu. K obarvení například fuchsinem nebo fluorescenčním barvivem auraminem je přinutíme přidavkem mořidla (fenolu), případně barvením za horka. Obarvené mykobakterie zase nelze odbarvit, a to ani pomocí směsi alkoholu s kys. chlorovodíkovou, proto se označují jako acidorezistentní tyčinky. (Votava, 2003)

Acidorezistence, tj. obtížná barvitelnost organickými barvivy a následná odolnost k odbarvení kyselinami, alkáliemi a alkoholem, je charakteristickým znakem všech mykobakterií. Souvisí s výše zmíněným vysokým obsahem lipidů v buněčné stěně a je jen vzácně pozorována i u jiných mikrobů, např. u nokardií a korynebakterií, kde je však nekonstantní a neúplná. V nátěrech z materiálu lze zachytit v tyčinkách hyperchromní Muchova granula. V mladých kulturách se mohou také vyskytovat neacidorezistentní formy zviditelněné kontrastním dobarvením. (Bednář, 1996)

Jedinečné složení buněčné stěny má kromě acidorezistence i vliv na další vlastnosti mykobakterií, jako jsou pomalý růst, odolnost vůči běžným detergentům a antibiotikům, odolnost vůči vysušení (mykobakterie si v zaschnutých kapičkách sputa zachovávají životaschopnost až několik měsíců) a na specifickou imunitní odpověď hostitele. Jsou citlivé na UV světlo, výborně je inaktivují fenolové sloučeniny. Oxidační činidla a aldehydy jsou rovněž účinné, avšak vyžadují použití vyšších koncentrací a prodloužení expozičních časů. (Liptáková, 2019)

5.1.2 Genom

Mykobakteriální genom, který byl zatím kompletně sekvenován pouze u kmene *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, je zatím nevyčerpatelným zdrojem informací o potenciálních faktorech virulence. Genom kmene H37Rv obsahuje asi 4000 genů a má určité

zvláštnosti v porovnání s jinými genomy. Asi 200 genů se účastní metabolismu mastných kyselin, což je skoro dvojnásobný počet než u jiných mikroorganismů s podobně velkým genomem. Dalším význačným znakem je přítomnost genů pro kyselé, na glycin bohaté proteiny. Jde asi o 172 genů, které představují přes 4 % genomu *M. tuberculosis*, nacházejí se však i u dalších mykobakterií. Funkce těchto proteinů není zatím známa. (Macela, 2006)

Genom mykobakterií je poměrně velký ($3-4 \times 10^9$ bp) a vyznačuje se vysokým podílem guaninu a cytosinu (61-71 %). U některých druhů je přítomna extrachromozomální DNA v plazmidech. V DNA mykobakterií se nacházejí specifické repetitivní elementy s velikostí až 5 kb, které hybridizují s fragmenty DNA využívanými jako genetické sondy při molekulární diagnostice. (Liptáková, 2019)

Rozpoznání skupinově nebo druhově specifických sekvencí DNA umožnilo konstrukci genetických sond pro průkaz mykobakterií v biologickém materiálu a k druhové identifikaci. Při polymerázové řetězové reakci (PCR) se při amplifikační fázi chromozomální DNA používá jako primerů oligonukleotidy o velikosti 30-200 bp, jejichž složení se určuje sekvenováním. Stanovením počtu a polohy zmíněných repetitivních elementů je využíváno při sledování přenosu a cirkulaci kmenů v populaci a představuje novou metodu tzv. molekulární epidemiologie. (Bednář, 1996)

5.1.3 Fyziologie a kultivace

Mykobakterie jsou aerobní a vyznačují se velmi dlouhou generační dobou, od několika hodin až po jeden den, proto většina z nich roste velmi pomalu. U *M. tuberculosis* je tato doba 20 až 30 hodin, ale například u *M. leprae* se odhaduje až na 10 až 20 dní. Kolonie se objevují až za několik týdnů, často jsou žlutě až oranžově pigmentované a některé se vyznačují drsným povrchem. I když většina roste na jednoduchých půdách s asparaginem, glycerolem, minerálními solemi, vejci nebo hovězím sérem, některá vyžadují další suplementaci (hemin nebo kyselinu pyrohroznovou). Některé mykobakterie je třeba kultivovat při teplotě nižší než 37 °C, jiné až při teplotách okolo 45 °C. *M. leprae* se i přes zkoušení několika laboratorních podmínek zatím nepodařilo *in vitro* kultivovat, což představuje překážku při studiu tohoto patogenu v laboratoři. Proto se růst *M. leprae* přednostně provádí na experimentálních zvířecích modelech, jako jsou pásovci a několik kmenů myší. (Bednář, 1996; Votava, 2003; Trombone, 2014)

V aerobních podmínkách a na speciálních vaječných půdách jsou kolonie u rychle rostoucích druhů viditelné za 2–7 dnů od inokulace (některé podmíněně patogenní

a saprofytické rody, např. *M. fortuitum* a *M. chelonae*), u pomalu rostoucích za 17-60 dní (např. *M. tuberculosis* komplex nebo *M. avium* komplex). V novějších tekutých médiích, jako je Middlebrookův bujón nebo Kirchnerův bujón, a s novějšími automatickými kultivačními systémy lze dosáhnout urychlení kultivačního procesu až o 14 dní. (Liptáková, 2019)

5.1.4 Patogenita a rozdělení

Většina mykobakterií žije saprofytický ve vodě a půdě, část z nich se může uplatnit jako oportunní patogeny zvířat a člověka. Pro některé (např. pro *M. tuberculosis* a *M. leprae*) jsou tkáně člověka a jiných teplokrevných obratlovců hlavní ekologickou nikou. (Votava, 2003)

Pro předběžnou klasifikaci mykobakterií se používají růstové vlastnosti a morfologie kolonií. Jak už bylo uvedeno, tak jsou *M. tuberculosis* a blízké příbuzné druhy zahrnuté do *M. tuberculosis* komplexu pomalu rostoucí bakterie a jejich kolonie jsou buď nepigmentované nebo béžové/okrové. Ostatní mykobakterie, označované jako netuberkulózní mykobakterie (NTM), byly původně klasifikovány Runyonem do 4 skupin podle rychlosti růstu a pigmentace (viz tab. 1). (Murray, 2012)

Tabulka 1 Přehled častěji se vyskytujících mykobakterií a jejich patogenita pro člověka, rozdělení podle rychlosti růstu a podle pigmentace kolonií

PŘEHLED ČASTĚJI SE VYSKYTUJÍCÍCH MYKOBAKTERIÍ			
skupina	druh	pigmentace	patogenita pro člověka
pomalu rostoucí	<u>komplex <i>M. tuberculosis</i>:</u>		
	<i>M. tuberculosis</i>	N	tuberkulóza (TBC)
	<i>M. africanum</i>	N	TBC v tropické Africe
	<i>M. bovis</i>	N	TBC krčních uzlin
	<i>M. bovis BCG</i>	N	vakcinační kmen
	<u>komplex <i>M. avium</i>:</u>		
	<i>M. avium ssp. avium</i>	N	pneumonie a lymfadenitidy
	<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i>	N	Crohnova choroba
	<i>M. intracellulare</i>	N	pneumonie a lymfadenitidy
	<i>M. kansasii</i>	F	chronická onemocnění plic
<i>M. marinum</i>	F	kožní granulomy	
<i>M. ulcerans</i>	N	tropický vřed Buruli	
<i>M. xenopi</i>	S	vzácně pneumonie	
<i>M. goodnae</i>	S	většinou pouhá kontaminanta	
rychle rostoucí	<i>M. fortuitum</i>	N	infekce ran, osteomyelitidy
	<i>M. chelonae</i>	N	kožní léze při imunosupresi
	<i>M. smegmatis</i>	S	infekce tkání po poranění
	<i>M. abscessus</i>	N	chronické infekce plic a ran
nerostoucí <i>in vitro</i>	<i>M. leprae</i>	-	malomocenství

Legenda: N - nechromogenní, F - fotochromogenní, S - skotochromogenní

zdroj: Votava, 2003

Některé mykobakterie (např. *M. kansasii*, obr. 2) produkují žluté karotenoidy jen na světle, jsou tedy označovány jako fotochromogenní. Skotochromogenní jsou mykobakterie rostoucí v barevných koloniích i potmě, a patří mezi ně např. *M. gordonae* (obr. 3). Nechromogenní mykobakterie (např. *M. avium* komplex) netvoří výrazně barevné kolonie. Poslední skupinou jsou rychle rostoucí mykobakterie (např. *M. fortuitum*, obr. 4), které vyrostou během několika dnů. (Votava, 2003)

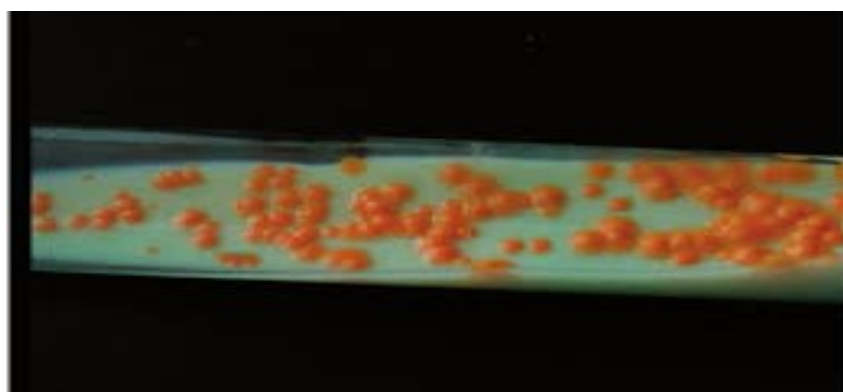
Toto dělení (tab. 1) a sledování vlastností na základě růstu a pigmentace má však v současnosti v diferenciální diagnostice už jen vedlejší úlohu. Biochemická aktivita mykobakterií je nepatrná. (Liptáková, 2019)



Obrázek 2 *Mycobacterium kansasii*, příklad pomalu rostoucích fotochromogenních mykobakterií.

Na tomto obrázku vidíme *M. kansasii* (světle žluté kolonie) po 15denní kultivaci při 37 °C na Löwensteinově-Jensenově půdě.

zdroj: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/mycobacterium-tuberculosis-photos/mycobacterium-kansasii.html>



Obrázek 3 *Mycobacterium gordonae*, příklad pomalu rostoucích skotochromogenních mykobakterií.

Vidíme *M. gordonae* (oranžovo/žluté kolonie) po 20 dnech kultivace při 42 °C na Löwensteinově-Jensenově půdě.

zdroj: Couto, 2013



Obrázek 4 Mycobacterium fortuitum, příklad rychle rostoucích nechromogenních mykobakterií. Vidíme M. fortuitum (bělavě okrové kolonie) na Löwensteinově-Jensenově půdě po 3denní kultivaci při 37 °C.

zdroj: Fang-Lan, 2010

5.2 Tuberkulóza

Jedná se o chronické granulomatózní onemocnění, které postihuje člověka, ostatní savce, vačnatce, ptáky, ryby, obojživelníky i plazy. Tuberkulózu (TBC) u savců způsobují čtyři úzce příbuzné druhy, *M. tuberculosis* (původce tuberkulózy u člověka), *M. bovis* (původce u hovězího dobytka), *M. microti* (původce u hrabošů) a *M. africanum*.

Tuberkulóza je tedy u člověka způsobena hlavně *M. tuberculosis*, někdy však také i *M. bovis*, jež je ale spíš hlavním původcem TBC u dobytka a některých dalších savců. *Mycobacterium africanum* má velmi variabilní vlastnosti, a proto je jeho taxonomická pozice někde mezi humánními a bovinními mykobakteriemi. Už podle názvu je patrné, že způsobuje tuberkulózu zejména u obyvatel rovníkové Afriky. *Mycobacterium microti* se v dnešní době izoluje vzácně. (Greenwood, 1999)

Tuberkulóza je infekční onemocnění se dvěma fázemi manifestace – primární a postprimární. Primární infekce je často asymptomatická, popřípadě s nespecifickými příznaky, a obvykle se spontánně vyhojí. Jako postprimární infekce se označují všechny formy u jedinců, kteří měli před propuknutím infekce pozitivní reakci v tuberkulinovém testu.

Rizikové faktory pro toto onemocnění lze ztotožnit s oslabenou imunitou organismu, např. při cukrovce, u virových infekcí včetně HIV, při imunosupresivní léčbě, při podvýživě, popřípadě u osob ve vyšším věku. Ze socioekonomického hlediska jsou velmi rizikovými skupinami především imigranti z oblastí s vysokým výskytem tuberkulózy, bezdomovci, alkoholici nebo osoby drogově závislé. (Macela, 2006)

5.2.1 Původce *Mycobacterium tuberculosis*

5.2.1.1 Popis a morfologie

Mycobacterium tuberculosis patří k nejdůležitějším patogenům člověka. Nakažena je asi jedna čtvrtina lidské populace. Zhruba u 10 % infikovaných se během života projeví příznaky tuberkulózy. Podle Světové zdravotnické organizace WHO každý rok tuberkulózou onemocní asi 10 miliónů lidí. Na tuberkulózu ročně umírá 1,4 miliónu lidí. *M. tuberculosis* objevil Robert Koch v roce 1882, a proto lze mikroba označovat i zkratkou BK (bacil Kochův). Spolu s geneticky blízkými *M. africanum*, *M. bovis* a jeho atenuovaným (vakcinačním) kmenem BCG (bacil Calmette-Guérin) se zařazuje do skupiny zvané *M. tuberculosis* komplex. (Votava, 2003; WHO, 2020)

Ve tkáních se *M. tuberculosis* vyskytuje v podobě velmi tenkých a rovných tyčinek (obr. 5) o rozměrech přibližně $0,4 \times 3 \mu\text{m}$. Na umělých médiích jsou pozorovány kokcoidní (připomínající korálky) a vláknité formy s variabilní morfologií od jednoho druhu k druhému. (Brooks, 2007)



Obrázek 5 Morfologie *M. tuberculosis*

Na obrázku vidíme počítačem generovaný 3D obraz *M. tuberculosis*. Vytvořeno federální agenturou Spojených států amerických CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

zdroj: Eckert, 2020

Tuberkulózní mykobakterie jsou nepohyblivé, nesporulující a nemající pouzdro. V preparátech z klinického materiálu (nejčastěji sputum) se vyskytují buď jednotlivě nebo v podobě shluků několika paralelně uspořádaných tyčinek. V preparátu z kultury jsou vidět

hadovitě propletené provazce, tomuto jevu se říká *cording* (z angl. *cord*, provazec) a je typický pro virulentní kmeny. (Greenwood, 1999; Votava, 2003)

5.2.1.2 Odolnost na zevní vlivy

Jak již bylo zmíněno, tak mají mykobakterie tendenci být odolnější vůči chemickým látkám než jiné bakterie zejména kvůli hydrofobní povaze buněčné stěny. Barviva (např. malachitová zeleň) nebo antibakteriální látky (např. penicilin), které jsou bakteriostatické vůči jiným bakteriím, mohou být přidávány do média, aniž by inhibovaly růst mykobakterií. Kyseliny a zásady umožňují přežití některých exponovaných mykobakterií a používají se k eliminaci kontaminujících mikroorganismů a ke zakoncentrování klinických vzorků. (Brooks, 2007)

M. tuberculosis je stejně jako ostatní mykobakterie vysoce odolné vůči vyschnutí, v prachu vydrží až 10 dnů a ve vyschlém sputu dokonce až 8 měsíců. Z dezinfekčních prostředků jsou na *M. tuberculosis* spolehlivě účinné především deriváty fenolu a aldehydy. Z oxidačních činidel jsou účinná jen některá a ta pak jen ve vyšší koncentraci a při prodloužené expozici. K poměrně účinným dezinfekčním prostředkům patří například lyzol (1%), formaldehyd (5%), Persteril (0,5%) nebo Chloramin B (až 5%). Detergenty jsou neúčinné. Dalším dobrým prostředkem k dekontaminaci je UV záření, protože k němu jsou mykobakterie velmi citlivé. (Votava, 2003)

5.2.2 Patogeneze a imunita

M. tuberculosis netvoří žádné toxiny, které by se daly považovat za faktory virulence. Faktorem spjatým s virulencí je povrchový glykolipid *cord factor*, nacházející se v buněčné stěně, chemicky se jedná o trehalózo-6,6-dimykolát (TDM), který zodpovídá za růst virulentních kmenů v již zmíněných dlouhých hadovitých provazcích. V infikovaných buňkách poškozuje mitochondriální membránu, čímž inhibuje dýchání a fosforylaci. Obecně je ale virulence dána zejména schopností *M. tuberculosis* přežít uvnitř makrofágů jedince, což se vysvětluje tím, že mykobakterie potlačují snižování pH ve fagozomech a následně jejich splývání s lysozomy. (Votava, 2003; Liptáková, 2019)

Mezi molekuly podílející se na patogenezi a virulenci patří mykobakteriální lipidy. Buněčná stěna je velmi bohatá na lipidy a je silně nepropustná. Protože obsahuje peptidoglykan, jsou mykobakterie odolné vůči kyselinám. Lipoarabinomanan (LAM) je konjugát složený z manosylfosfát inositolu (MPI), polysacharidové páteře a různých druhů krycích motivů. Jeho správná translokace do buněčné stěny představuje důležitou vlastnost pro stabilitu

mykobakterií. LAM navíc inhibuje zrání fagozomu a umožňuje intracelulární přežití. LAM se uvolňuje v makrofázích a reaguje s endomembránami, což je nezbytné pro blokování zachytu fagozomů a dodání lysozomálních hydroláz přes molekulu EEA₁ (z angl. *Early Endosomal Autoantigen 1*). Dochází k blokaci fagozomálního okyselení. Lipomanan (LM) je multiglykosylovaný lipid nebo polymanosylovaný fosfatidylinositol manosid (PIM). Jeho diacylované molekuly regulují a inhibují produkci sekrece oxidu dusnatého a cytokinů v aktivovaných makrofázích. TDM je nejhojnějším a nejtoxičtějším lipidem v obalu mykobakteriálních buněk. TDM podporuje angiogenezi, inhibuje okyselení fagolysosomu, brání fúzi fagozomu s lysozomem závislou na Ca²⁺ a odstraňování povrchových lipidů mykobakterií. Důležité v patogenezi jsou rovněž sekreční systémy mykobakterií (např. transportér TAT, z angl. *twin arginine translocation*, nebo transportér ESX, z angl. *export pathway*). Molekulární migrace přes buněčnou stěnu představuje důležitou událost související s interakcí prostředí a hostitelských buněk. Roli v patogenezi hrají i mykobakteriální lipoproteiny, jejich funkce souvisí s molekulárním exportem, stálostí buněčné stěny, příjmem živin a tím přispívá k interakci hostitel-patogen. (Echeverria-Valencia, 2017)

Infekce se přenáší vdechnutím *M. tuberculosis* v aerosolu nebo prachu. Infekční dávka u lidí je velmi nízká, infekci může způsobit vdechnutí méně než 10 mykobakterií. Právě vzdušný přenos tuberkulózy je velice účinný, protože nemocní vykašlávají velké množství mykobakterií, které se snadno šíří v okolním prostředí a díky svému voskovitému obalu dokážou přežívat vyschnutí a dlouho se udržovat ve vzduchu a v prachu. Vykašlané sputum infikovaného pacienta může obsahovat až několik milionů mykobakterií na mililitr. (Herman, 2006; Goering, 2016)

Imunitní odpověď je typu buněčné přecitlivělosti a klinický obraz tuberkulózy je dán paradoxním účinkem obranné reakce, která destruuje určitou tkáň, a jinými patologickými projevy. Výsledkem této reaktivity je to, že má lidská tuberkulóza primární a postprimární formu se zcela odlišnými příznaky. (Greenwood, 1999)

5.2.2.1 Primární tuberkulóza

V době expozice vstupuje tuberkulóza do dýchacích cest a infekční částice pronikají do alveolů, kde jsou fagocytovány alveolárními makrofágy. Na rozdíl od většiny ostatních fagocytovaných bakterií, *M. tuberculosis* brání fúzi fagozomu s lysozomy blokováním specifických přemostujících molekul (včasných endozomálních autoantigenů 1-EEA₁). Fagozom je zároveň schopen fúzovat s jinými intracelulárními vezikuly, což umožňuje přístup

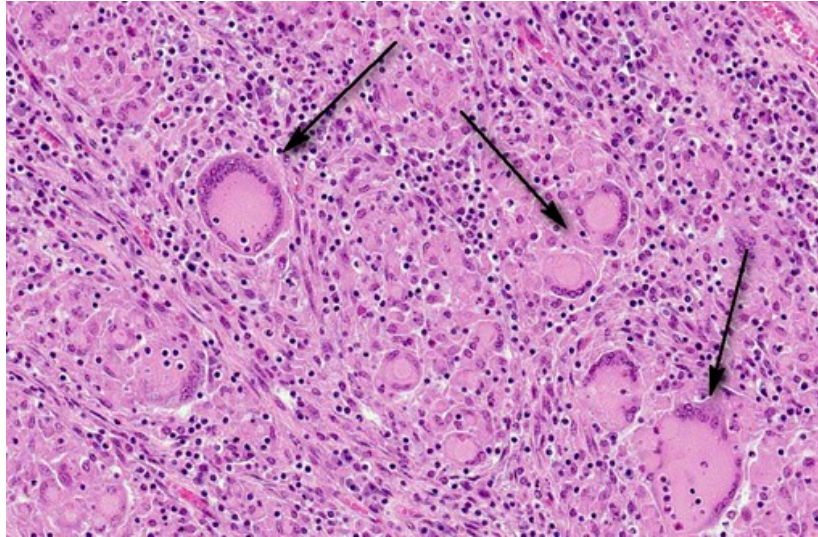
k živinám a následné množení uvnitř fagozomu. Fagocytované bakterie jsou také schopny vyhnout se likvidaci makrofágy zprostředkované reaktivními meziprodukty dusíku, které se vytvářejí reakcí mezi oxidem dusnatým a superoxidovým aniontem. (Murray, 2012; Liptáková, 2019)

V makrofázích se tedy mykobakterie pomnožují a vytvářejí primární lézi, tzv. Ghonovo ložisko. Makrofágy zčásti hynou a zčásti zanesou mykobakterie do hilových lymfatických uzlin a vytvoří se primární komplex. Kromě toho jsou mykobakterie prostřednictvím krevních a lymfatických cév roznášeny do dalších orgánů a tkání, včetně ostatních oblastí plic. Navíc může při infekci bovinními mykobakteriemi v mléce vzniknout primární komplex na tonzilách a v krčních uzlinách, tzv. skrofula, nebo ve střevech, obvykle v ileocekální oblasti a v mezenterických uzlinách. (Greenwood, 1999)

V lymfatických uzlinách je stimulována imunitní buněčná odpověď, která je prokazatelná po 4-6 měsících kožním tuberkulinovým testem, při němž se do kůže vpravuje proteinový derivát PPD, připravený z kultur mykobakterií. Pozitivní test se projeví po 48-72 hodinách zduřením a erytémem v místě vpichu. (Goering, 2016)

Jak už bylo řečeno, část mykobakterií tedy přeci jenom uhyne, jejich bílkoviny jsou rozštěpeny a antigenní polypeptidy se v souvislosti s molekulami MHC (z angl. *Major histocompatibility complex*) II. třídy dostanou na povrch makrofágů. Když se ocitne v blízkosti specifický T-lymfocyt, který rozezná obě složky (antigen i molekulu MHC), aktivuje se a tím se zahájí imunitní reakce, čímž se zvýší počet reagujících T-lymfocytů a NK buněk. Buňky T_{H1} (CD4⁺) po styku s mykobakteriálními antigeny uvolňují IL-2, IL-12 a interferon gama (INF- γ), které aktivují makrofágy. Makrofágy uvolňují tumor nekrotický faktor TNF- α , který navíc stimuluje produkci oxidu dusnatého a souvisejících reaktivních dusíkatých meziproduktů, což vede ke zvýšenému intracelulárnímu zabíjení. Pacienti, kteří mají sníženou produkci IFN- γ nebo TNF- α , anebo mají vady v receptorech pro tyto cytokiny, jsou vystaveny vyššímu riziku závažných mykobakteriálních infekcí. Dále se uvolňují chemokiny přitahující do místa vstupu monocyty i lymfocyty. Z monocytů vznikají další makrofágy. (Votava, 2003; Murray, 2012)

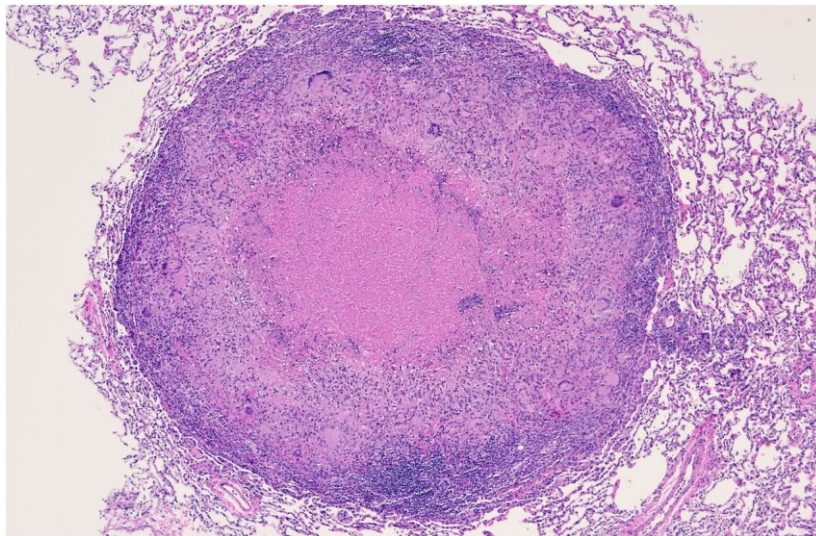
Tyto aktivované makrofágy se podle podobnosti s epitelovými buňkami označují jako epiteloidní buňky. Některé splývají v obrovské mnohojaderné buňky Langhansovy (obr. 6). Z ložiska se stává tzv. granulom. Střed granulomu obsahuje směs nekrotické tkáně a mrtvých makrofágů, podle sýrovité konzistence a vzhledu se tento jev označuje jako kaseifikace (obr. 7). (Greenwood, 1999)



Obrázek 6 **Langhansovy buňky**

Šipky nám na tomto obrázku ukazují mnohojaderné obří buňky Langhansovy v granulomu. Makrofágy jsou spojené dohromady a jádra tvoří tvar podkovy kolem okraje buňky. Preparát je barven technikou hematoxylin-eosin. Zvětšení 100×.

zdroj: <http://www.medical-labs.net/giant-langhans-cell-and-mycobacterium-tuberculosis-2459/>



Obrázek 7 **Plicní granulom**

Na obrázku je patrný centrálně nekrotizující plicní granulom. Střed obsahuje směs nekrotické tkáně a mrtvých makrofágů. Lze pozorovat i velké Langhansovy buňky na periferii granulomu. Preparát je barven technikou hematoxylin-eosin. Zvětšení 40×.

zdroj: Ling Lin, 2018

Aktivované makrofágy zabraňují replikaci mykobakterií, zabíjejí pohlcené mykobakterie, ale přitom bohužel ničí i okolní tkáň. Makrofágy granulomu mají intenzivní metabolismus a spotřebují kyslík, mykobakterie jsou pravděpodobně usmrcovány anoxií a acidózou ve středu léze. Cytotoxické buňky T_C (CD8⁺) jsou schopny rozpoznat a svými

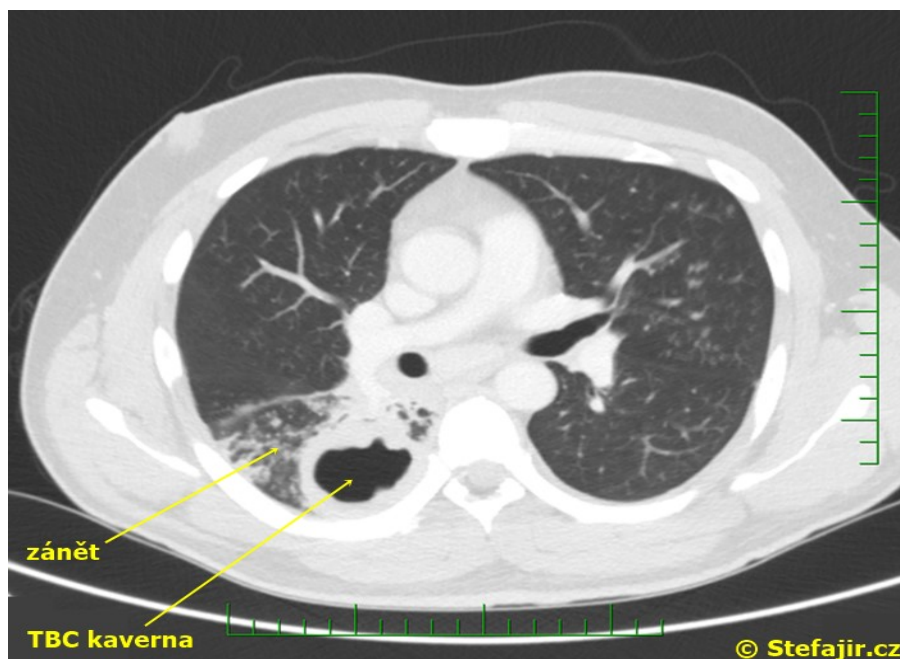
perforiny zničit infikované fagocyty. Mykobakterie uvnitř jsou zabity pomocí enzymu granulolyzinu. Vytvoření granulomu většinou postačuje k omezení primární infekce, protože se léze zklidní, fibroblasty vytvářejí pevnou jizvu, která později kalcifikuje. Nedochozí však ke zničení všech mykobakterií. Některé zůstávají jako perzistoři v klidovém stavu a po jejich reaktivaci způsobují postprimární onemocnění. (Greenwood, 1999; Votava, 2003)

Někdy může v jednom ložisku nastat progresse, která se projeví jako primární onemocnění včetně primárních lézí, pneumonie, tuberkulózní osteomyelitidy, tuberkulózní meningitidy, pleuritidy, postižení ledvin a páteře (Pottova choroba). Proniknou-li v extrémních případech mykobakterie do oběhu, jsou rozneseny do celého těla a vyvíjejí se četné granulomy v orgánech. Jedná se o velmi vážný stav známý jako miliární (diseminovaná) tuberkulóza. (Greenwood, 1999; Harvey, 2007)

5.2.2.2 Postprimární tuberkulóza

Po měsících, letech až desítkách let se může tuberkulózní ložisko buď reaktivovat nebo dojde k exogenní reinfekci. Vzniká tzv. postprimární tuberkulóza, která se v mnoha aspektech liší od primární formy onemocnění. Reaktivace je zjevně způsobena podlomeným imunitním stavem, často spojeným s podvýživou, alkoholismem, těžkým stresem, pokročilým věkem, imunosupresivními léky, nebo nemocemi, zejména cukrovkou a HIV. Dochází k ní téměř vždy v horních plicních lalocích, kde je vysoká tenze kyslíku, což podporuje růst mykobakterií. Výsledkem je rozsáhlý tuberkulom, který uvnitř kolikvuje, zvětšuje se a může se vyprázdnit do bronchu. (Votava, 2003; Harvey, 2007)

Proteolytické enzymy uvolněné aktivovanými makrofágy změkčují a zkapalňují kaseózní zbytky. Uvnitř tuberkulomu je silně kyselá reakce, anoxie a zcela malé množství živých mykobakterií. Léze se zvětšuje, poškozují bronchy, obsah se vyprazdňuje a vzniká kaverna (obr. 8). Složení vzduchu v plicích je příhodné pro množení mykobakterií, jež osídlují stěnu kaverny. Proto byla před érou chemoterapie základní metodou léčby likvidace vzniklé kaverny buď léčebným pneumotoraxem nebo chirurgickým odstraněním přilehlé žeberní části hrudní stěny (torakoplastikou). (Greenwood, 1999)



Obrázek 8 TBC kaverna

Obrázek představuje CT (Computed Tomography) nález, který dobře ukazuje rozsáhlé zánětlivé změny pravé plíce s objemnou silnostěnnou tuberkulózní kavernou.

zdroj: Štefánek, 2021

Vzniká tedy kaverna s rychle se množícími mykobakteriemi, ty se uvolňují do sputa a šíří do jiných oblastí plic, do laryngu, polknutím do střev a při kašli se z dutiny ústní přenášejí na nového hostitele (tzv. otevřená tuberkulóza). Destrukce postižených tkání vede k vykašlávání krve (hemoptýze), uvolňující se TNF- α vyvolává zvýšení teploty a hubnutí. Sekundární ložiska mohou být při tuberkulóze ledvin i v močovém měchýři a nadvarlatech. Postprimární kožní TBC (*lupus vulgaris*) postihuje nejvíce obličej a krk. Když není léčena, přechází do chronicity a způsobuje jizvení a hrubé deformace. Mohou se vytvářet pístěle, jdoucí z lymfatické uzliny na povrch kůže (*skrofuloderma*). (Greenwood, 1999; Votava, 2003)

5.2.2.3 Tuberkulóza u osob s oslabenou imunitou

Při oslabení imunity osob je reaktivace velmi pravděpodobná, zejména u starých osob, u pacientů po transplantaci a také u osob HIV pozitivních. U pacientů s HIV infekcí se onemocnění obvykle objevuje dříve, než se objeví znaky syndromu získaného imunodeficitu (AIDS) a před nástupem jiných oportunních infekcí. Je dvakrát větší pravděpodobnost, že se rozšíří i mimo plíce, a může rychle vést k úmrtí. Pro příklad v roce 2019 bylo zaznamenáno 10 miliónů nových případů onemocnění tuberkulózou a z toho 8,2 % (tedy kolem 820 000)

u HIV pozitivních osob. Přičemž v tomto zmiňovaném roce bylo hlášeno celkem 208 000 úmrtí na TBC u HIV pozitivních osob. (Murray, 2012; WHO, 2020)

Kaverny nevznikají, což potvrzuje význam imunitní reakce hostitele v patogenezi. Místo kaverny vzniká v plicích difuzní infiltrát, hematogenní a lymfogenní cestou vznikají infiltráty i v jiných částech těla. Někdy se po celém těle vyvíjejí četné drobné léze, hustě naplněné mykobakteriemi. Jedná se o rychle progredující smrtelnou formu tuberkulózy, tzv. kryptickou diseminovanou tuberkulózu. (Greenwood, 1999)

5.2.3 Klinické příznaky

Nástup tuberkulózy je plíživý, infekce poměrně dlouhou dobu postupuje, aniž by se pacient cítil nemocný a vyhledal lékařskou péči. Primární tuberkulóza je obvykle mírná až asymptomatická. Asi v 90 % případů se dále nerozvíjí, ve zbývajících 10 % se ovšem rozvíjí v klinické onemocnění. Protože jsou mykobakterie schopné osídlit téměř všechna místa v těle, tak jsou klinické příznaky různé. Obvyklá je únava, úbytek váhy, slabost, zvýšená teplota a noční pocení. Plicní tuberkulóza je spojena s chronickým a produktivním kašlem, sputum může obsahovat krev z destruovaných tkání. Během infekce TBC je výrazně ovlivněn i hematopoetický systém. Jsou ovlivněny jak myeloidní, tak lymfoidní buněčné linie a složky plazmy. Konkrétně u plicní tuberkulózy je běžných mnoho hematopoetických abnormalit a mohou být tedy nástrojem pro diagnostiku. Nejčastější hematopoetickou abnormalitou je anémie, dalšími jsou leukocytóza, trombocytóza, monocytóza a lymfocytóza. To naznačuje systémovou odpověď pacienta na probíhající zánětlivé procesy v těle.

Komplikace jsou způsobeny lokálním šířením a diseminací. Mykobakterie mohou diseminovat krevním a lymfatickým oběhem do dalších částí těla. K tomu dochází zejména v období primární infekce. Následkem je tvorba chronických lézí s pokračující nekrózou a destrukcí dané tkáně (např. ledvin). Šíření je možné i extenzí do sousedních částí plic. Například pokud tuberkulom eroduje do bronchu a přenesení tam svůj obsah, nebo do pleurální dutiny, kdy je následkem pleurální výpotek. (Goering, 2016; Abay, 2018)

5.2.4 Epidemiologie

Tuberkulóza se u lidí vyskytuje už od pravěku, nejstarší jednoznačný nález *Mycobacterium tuberculosis* pochází z pozůstatků bizona starého přibližně 18 000 let. Kosterní pozůstatky ve východním středomoří z roku 7000 př. n. l. svědčí o tom, že někteří lidé v té době byli nakaženi tuberkulózou. Znamky tuberkulózy se našly i u mumii z období 3000–2400 let př. n. l. Okolo roku 460 př. n. l. popsal Hippokrates tzv. fízu (řecký výraz pro tuberkulózu)

jako nejrozšířenější onemocnění té doby, které se projevuje vykašláváním krve a horečkou a je téměř vždy smrtelné. Hippokrates si myslel, že je nemoc z velké části zděděna. Významný doklad o přenosu onemocnění uvedl Sokrates. Aristoteles (384–322 př. n. l.) už dokonale popsal problém kontagiozity (nakažlivosti). Podle něj je nejčastějším zdrojem nákazy člověk postižený ftízou a branou vstupu je dýchací systém. Stejný názor o nakažlivosti měl Galenos (129-199 n.l.), největší z římských lékařů, který navíc definoval ftízu jako plicní ulceraci. Tento opačný názor na počátky tuberkulózy se objevil i ve druhé polovině 17. století. Italští lékaři pokračovali v Galenových myšlenkách a stále tvrdili, že TBC je nakažlivá, čímž ovlivňovali země ve středomořské pánvi. Naopak lékaři a učenci v severních zemích upřednostňovali ústavní nebo dědičné příčiny této nemoci. Tento rozdíl v chápání původu nemoci dosáhl svého vrcholu v 19. století. V roce 1865 francouzský vojenský lékař Jean-Antoine Villemin podal experimentální důkaz o přenosnosti tuberkulózy tím, že byl schopen infikovat tuberkulózou laboratorní králíky naočkováním tuberkulózní tkáně z mrtvol. Tento důkaz byl okamžitě napaden francouzským zdravotnickým zařízením, zejména Hermanem Pidouxem, který tvrdil, že musí existovat sociálnější řešení problému, který on i ostatní pociťovali jako vznik onemocnění v chudších třídách, u osob podvyživených, při špatné hygieně a přepracování. Roku 1882 německý lékař Robert Koch objevil a popsal původce tuberkulózy, za což v roce 1905 získal Nobelovu cenu. Ve druhé polovině 19. století byly vytvořeny základy racionální klimatoterapie tuberkulózy a zřizovaly se první léčebné ústavy. V bývalém Československu se roku 1946 začal uplatňovat jednotný systém boje proti TBC, který kladl důraz na prevenci. Jedním z prvních kroků prevence bylo zavedení očkování BCG vakcínou. Postupně byla objevena a do praxe uvedena antituberkulotika jako streptomycin, ethionamid, cykloserin, etambutol nebo rifampicin, což umožnilo skutečnou léčbu tuberkulózy. (Smith, 2003; Liptáková, 2019)

Přestože tuberkulózou mohou být postiženi primáti a laboratorní zvířata, jako jsou morčata, jediným přirozeným rezervoárem onemocnění jsou lidé. Toto onemocnění se šíří kontaktem člověka s člověkem vdechováním infekčního aerosolu. Velké částice bakterií jsou zachyceny na slizničních površích a odstraňovány pomocí řasinkového dýchacího epitelu. Malé částice obsahující 1-3 tuberkulózní bacily se však mohou dostat do alveolárních prostor, a tak vyvolat infekci. (Murray, 2012)

Tuberkulóza se tedy přenáší hlavně inhalací mykobakterií ve vlhkých kapénkách, které vykašlávají nemocní s otevřenou plicní tuberkulózou. Méně nebezpečný je prach se zaschlými mykobakteriemi. Infekční je jen sputum bakteriologicky pozitivních pacientů, a to když 1 ml

sputa obsahuje nejméně 5000 mykobakterií. Onemocnění se nejvíce přenáší v domácnosti nebo v prostředí, kde jsou po dlouhou dobu osoby v blízkém kontaktu. Pro epidemiologické účely se incidence infekce v komunitě počítá z počtu neočkovaných osob různých věkových skupin, které mají pozitivní tuberkulinovou reakci. Výskyt infekcí za rok nepřímou udává počet osob, které mají otevřenou tuberkulózu nebo jinou infekční formu. Obecně platí, že při incidenci 1 % za rok připadá na 100 000 osob 50 nových infekcí. Prevalence v dané oblasti neznámá totéž, co incidence, neboť pouze u malé části infikovaných se rozvine zjevné onemocnění a nakažení onemocní až za několik let. (Greenwood, 1999)

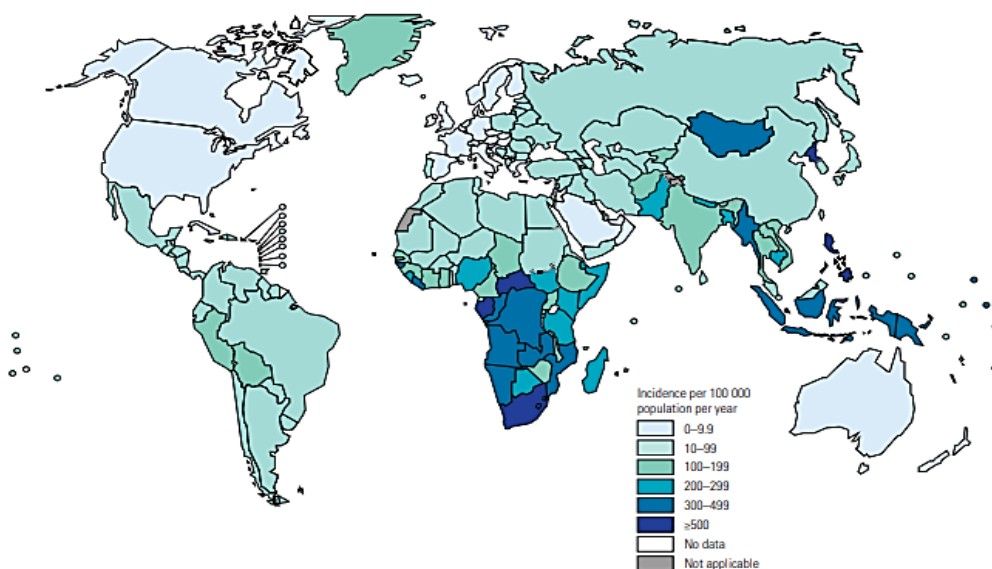
Tuberkulóza je pandemicky rozšířenou infekcí. Asi čtvrtina světové populace je infikována, roční incidence je asi 10 miliónů nových onemocnění a ročně umírá kolem 1,4 miliónů nemocných. Asi 95 % z těchto parametrů připadá na rozvojové oblasti třetího světa. Dříve neznámými faktory globální epidemiologie se stala infekce HIV, která značně zvrátila příznivý vývoj kontroly tuberkulózy a zvyšující se výskyt multirezistentních kmenů, který vrhá problém TBC do období před objevem antituberkulotik. (Bednář, 1996; WHO, 2020)

Pro svou zákeřnost a hromadný výskyt je stále sledovaná odděleně od ostatních infekčních chorob. V současnosti je druhou nejčastější smrtelnou infekční chorobou světa (po HIV). Významně se šíří v rozvojových zemích a v zemích tzv. třetího světa. Toto onemocnění je běžné v Číně, Indii, Pákistánu, východní Evropě, subsaharské a v jižní Africe. Jako každá infekce, tak se i TBC mění s vývojem civilizace. Po příčinách, které vedly k nové vlně rozšíření tuberkulózy (migrace, turistika, války, zhoršení sociálních faktorů v důsledku politicko-ekonomických změn), do popředí vystupují další faktory, zmíněná multirezistence kmenů a světová pandemie infekce HIV. Varovným trendem v posledních letech je nárůst infekcí způsobených rezistentními kmeny mykobakterií. (Liptáková, 2019)

TBC je onemocnění spojené s chudobou, ale zároveň může být také její hlavní příčinou v rozvojových zemích a zemích třetího světa. Tuberkulóza zde přednostně ovlivňuje ekonomicky aktivní věkovou skupinu, tři čtvrtiny všech případů se vyskytují ve věku 14 až 54 let a 17 % těch, kteří na toto onemocnění zemřou, je ve věku 15 až 49 let. Jeden případ TBC způsobí pokles příjmu v domácnosti v průměru o 25 %. (Talbot, 2015)

V roce 2019 bylo podle WHO ve světě hlášeno již zmíněných 10 miliónů nově nemocných, jejich počet v posledních letech klesá velmi pomalu. Podle odhadů bylo zaznamenáno kolem 1,2 miliónů úmrtí na TBC u HIV negativních lidí, což představuje snížení oproti předcházejícím rokům (např. z 1,7 miliónů v roce 2000), a dalších 208 000 úmrtí u HIV pozitivních lidí (snížení z 678 000 v roce 2000). Více onemocnění TBC bylo hlášeno u mužů

56 %, ženy představovaly 32 % a děti do 15 let 12 %. Mezi všemi postiženými bylo 8,2 % HIV pozitivních pacientů. Většina infikovaných lidí byla geograficky z oblastí jihovýchodní Asie (44 %), Afriky (25 %) a západního Pacifiku (18 %). Pod 10 % bylo hlášeno ve východním Středomoří (8 %), v Americe (2,9 %) a v Evropě (2,5 %) (obr. 9). Nejvíce nemocných lidí hlásily Indie (26 %), Indonésie (8,5 %), Čína (8,4 %), Filipíny (6,0 %), Pákistán (5,7 %), Nigérie (4,4 %) a Bangladéš (3,6 %) (obr. 10).



Obrázek 9 Odhadovaná míra výskytu TBC na 100 000 obyvatel v roce 2019

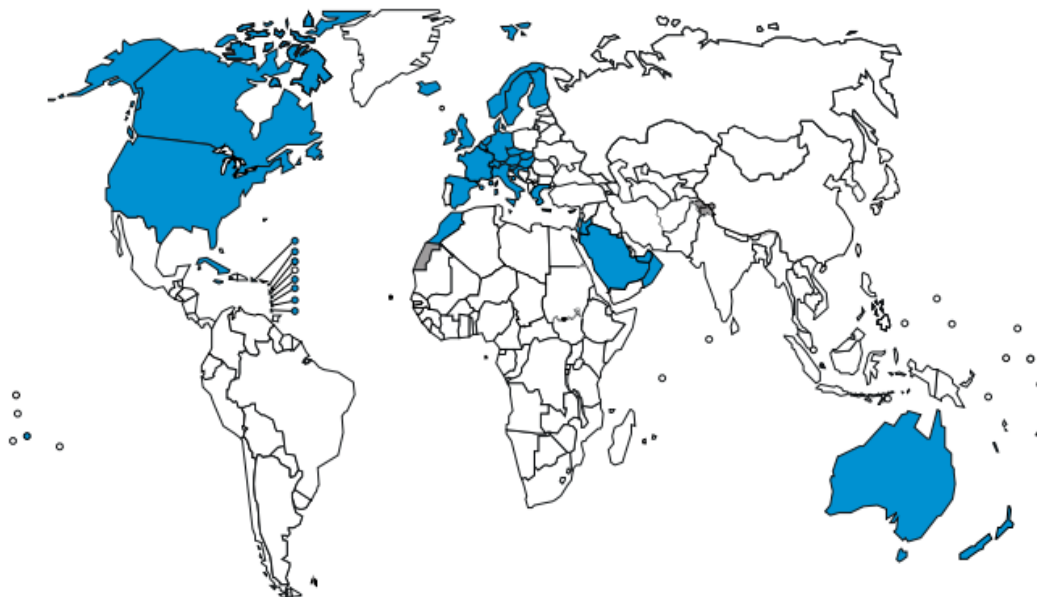
zdroj: WHO, 2020



Obrázek 10 Země, které v roce 2019 zaznamenaly nejméně 100 000 případů TBC

zdroj: WHO, 2020

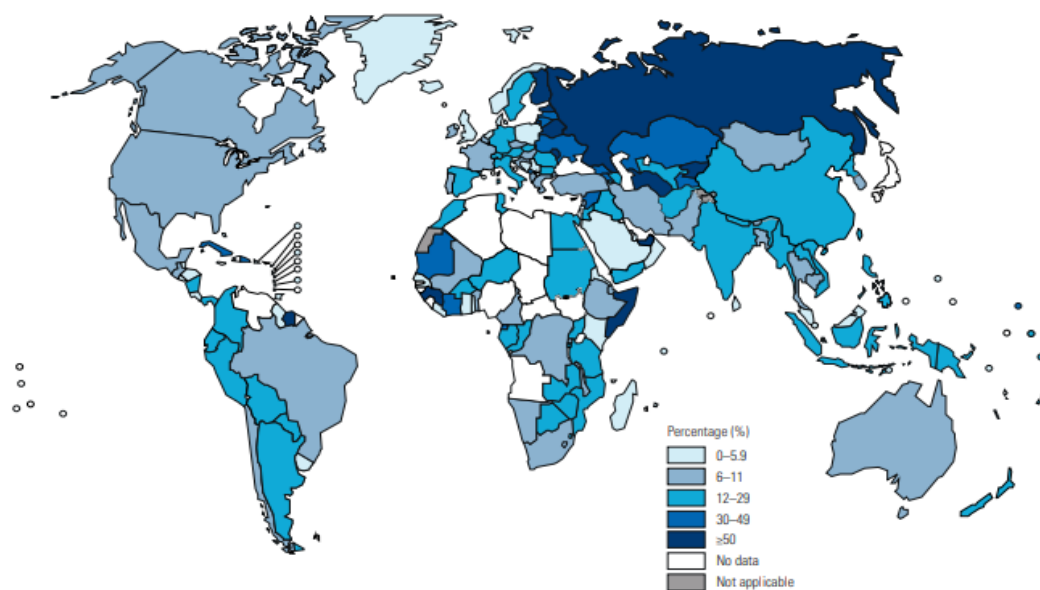
Míra výskytu TBC na národní úrovni se liší od méně než 5 do více než 500 nových případů a relapsů na 100 000 obyvatel ročně. V roce 2019 mělo 54 zemí nízký výskyt TBC (pod 10 případů na 100 000 obyvatel), většinou v regionu Evropy a Ameriky, plus několik zemí ve východním Středomoří a v západním Pacifiku (obr. 11).



Obrázek 11 Země (modře), u nichž byla v roce 2019 odhadována míra výskytu TBC nižší než 10 na 100 000 obyvatel

zdroj: WHO, 2020

TBC rezistentní na léky je i nadále velkým problémem. V roce 2019 téměř 0,5 miliónu případů vykazovalo rezistenci na rifampicin (RR rezistenci), z toho 78 % kmenů bylo multirezistentních (MDR). Celosvětově mělo MDR a RR v roce 2019 3,3 % nových případů a 17,7 % dříve léčených případů. Nejvyšší podíl (více než 50 % v dříve léčených případech) byl zaznamenán v zemích bývalého Sovětského svazu (obr. 12). (WHO, 2020)



Obrázek 12 Procento dříve léčených případů TBC MDR/RR

zdroj: WHO, 2020

Výskyt TBC v České republice od 60. let významně klesá. Tento pokles je v souladu s poklesem obecně pozorovaným v celé Evropské unii (EU). V roce 2005 poprvé poklesl počet nově hlášených případů pod 10 případů / 100 000 obyvatel, což bylo dokonce pod průměrným počtem oznámení v EU v roce 2015 (11,7 / 100 000 obyvatel). Podle Registru tuberkulózy bylo v ČR v roce 2017 hlášeno 505 (4,8 / 100 000 obyvatel) případů TBC všech typů a lokalizací. ČR společně s 22 zeměmi již splňuje cíl Světové zdravotnické organizace (WHO), který je nastaven pod 10 případů / 100 000 obyvatel. Zatímco jiné země EU (Rumunsko, Litva) uvádějí míru TBC stále nad 50 / 100 000 obyvatel. Úmrtnost na TBC byla v roce 2017 0,24 / 100 000 obyvatel. TBC se v ČR vyskytuje daleko častěji u mužů než u žen, muži představovali přes 70 % případů. U žen většinou postihuje věkovou skupinu 75+, zatímco u mužů lze vyšší výskyt pozorovat již od 45 let. (Fernandová, 2019)

V roce 2018 bylo v ČR do Registru tuberkulózy hlášeno 444 onemocnění TBC všech forem a lokalizací, což představuje 4,2 případů / 100 000 obyvatel. V porovnání s předchozím rokem se stav snížil. V roce 2019 bylo hlášeno celkem 464 onemocnění TBC (4,3 případů / 100 000 obyvatel). V porovnání s předchozím rokem se počet případů zvýšil. Z dlouhodobého hlediska však vykazuje počet onemocnění TBC u nás trvale klesající trend a v mezinárodním srovnání patříme k zemím s nízkým výskytem nemoci. Nejvíce případů bývá zaznamenáno v Praze. (ÚZIS, 2019)

Tuberkulóza dobytka se šíří mezi zvířaty a občas může respirační cestou postihnout i ošetřovatele dobytka. Kolem 1 % infikovaných krav má TBC vemene, odkud mykobakterie pronikají do mléka, jimž se mohou zdravé osoby rovněž nakazit deglutiční cestou. Primární TBC vyvolaná *M. bovis* postihuje krční nebo mezenterické uzliny. Přenosu tímto způsobem lze zabránit pasterizací nebo zahřátím mléka. (Greenwood, 1999)

V současnosti hrozí, že pandemie COVID-19 zvrátí pokrok ve snižování celosvětové zátěže onemocněním TBC. Celosvětový počet úmrtí na TBC by se mohl zvýšit přibližně o 0,2-0,4 miliónů pouze v roce 2020, pokud dojde k narušení zdravotnických služeb do té míry, že počet detekovatelných a léčených lidí s TBC klesne o 25-50 % po dobu 3 měsíců. Například v Indii, v Indonésii, na Filipínách, a v Jižní Africe, tedy ve čtyřech zemích, které tvoří 44 % celkových případů TBC, došlo již mezi lednem a červnem 2020 k poklesu hlášeného počtu osob s diagnostikovanou TBC. Ve srovnání se stejným obdobím v roce 2019 bylo v těchto zemích celkové snížení hlášených lidí s TBC v rozmezí 25-30 %. (WHO, 2020)

5.2.5 Klinická diagnostika

5.2.5.1 Anamnéza

Prvním důležitým krokem v diagnostice je anamnéza, která následně spouští diagnostické postupy. V ní se zaměřuje nejdříve na celkovou historii pacienta a jeho prodělaných onemocnění. Velmi důležitý je také zdravotní stav rodiny, lidí v blízkosti pacienta a osob, se kterými pacient přichází do styku. (Liptáková, 2019)

5.2.5.2 Tuberkulinový test – Mantoux test

Jedná se o kožní zkoušku, jejíž principem je intradermální aplikace tuberkulinu (nejčastěji na dorzální stranu předloktí) a sledování vzniku indurace kůže v místě vpichu po 48-72 hod. Výsledky testu musí být hodnoceny zkušeným personálem, protože je ke správnému posouzení nutno vzít v úvahu i míru rizika předchozí expozice *M. tuberculosis*. (Pernicová, 2020)

Základem je purifikovaný proteinový derivát PPD, což je bílkovinná frakce připravená z filtrátu bakteriální struktury *M. tuberculosis*. Z důvodu standardizace bylo vyrobeno několik kilogramů bakteriální masy jediného kmene (RT 23) a takto připravený tuberkulin (PPD RT 23) se používá už mnoho let. Je k dispozici v různých koncentracích, u nás se obvykle aplikuje 0,1 ml obsahujících 2 tuberkulinové jednotky. (Liptáková, 2019)

Indurace (obr. 13) velikosti 5-10 mm nejčastěji znamená imunitu po očkování, reakce větší než 15 mm je známkou přítomnosti senzibilizovaných T lymfocytů (opožděný typ hypersenzitivní reakce), který je typický pro latentní TBC. Velikost indurace nekoreluje s pravděpodobností přítomnosti aktivní TBC ani s imunitou po proběhlé TBC infekci, odpovídá však pravděpodobnosti rozvoje onemocnění v budoucnu v případě latentní formy. Pokud v místě vpichu tuberkulinu vznikne puchýřek, bula, vřed, nebo nekróza, značí to vyšší stupeň senzitivity vůči tuberkulinu, a tedy i přítomnost bakterií v organismu.



Obrázek 13 Pozitivita kožního tuberkulinového testu

Na obrázku vidíme pozitivní tuberkulinový test na dorzální straně předloktí. Za 72 hodin došlo ke vzniku indurace kůže v místě vpichu tuberkulinu. Podle velikosti indurace lze předpokládat, že se zde jedná o latentní TBC.

zdroj: <https://cs.fehrplay.com/zdorove/124380-virazh-tuberkulinovoy-proby-u-detey-prichiny-simptomu-diagnostika-i-osobnosti-lecheniya.html>

Mantoux test má nízkou senzitivitu i specifitu, může tedy být falešně pozitivní (při infekci způsobené netuberkulózními mykobakteriemi nebo po očkování BCG vakcínou) i falešně negativní (při nesprávné technice aplikace tuberkulinu nebo u velmi čerstvé či naopak dávné infekce TBC). Dnes je tento typ testu nahrazován IGRA testy (*Interferon-Gamma Release Assay*), které jsou v této práci podrobně popsány v kapitole laboratorní diagnostiky. (Pernicová, 2020)

5.2.5.3 Klinické vyšetření

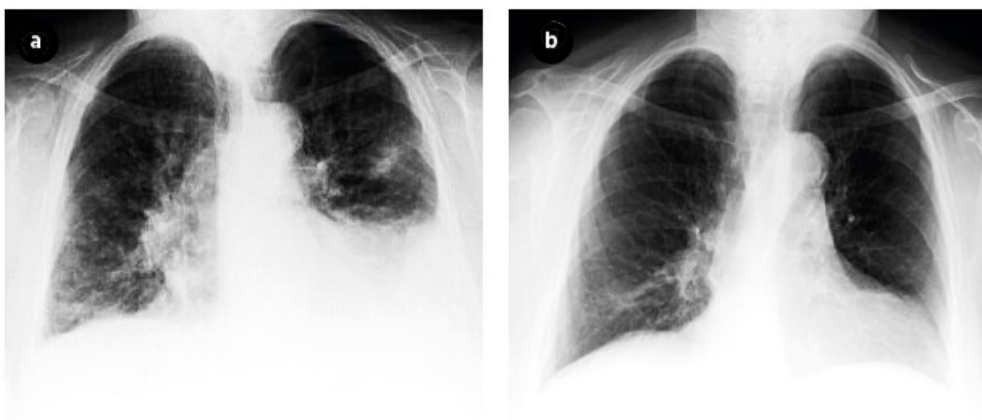
Celkové klinické vyšetření je dalším důležitým diagnostickým postupem, protože představuje celkový stav organismu, který se ověří např. auskultací (poslechem) dýchacího

traktu, palpací (pohmatem) v oblasti břicha a regionálních lymfatických uzlin, i celkovým laboratorním vyšetřením. (Liptáková, 2019)

Objektivní nález je u TBC velmi chudý nebo nespecifický. V pokročilých fázích je patrný úbytek tělesné hmotnosti až kachexie. Nemocný pacient suše pokašlává, nebo může být objektivně klidově dušný při rozsáhlém plicním postižení. Fyzikální nález na plicích je obvykle normální. Při postižení kloubů a kostí se nad postiženou lokalitou objevuje bílé zduření, v případě tvorby abscesů se mohou provalit navenek a vzniknout chronické, špatně se hojící píštěle. Postižení ledvin a močových cest má minimum symptomů, obvykle může být zachyceno jako tzv. sterilní pyurie. (Vašáková, 2016)

5.2.5.4 Zobrazovací metody

Rentgenologické vyšetření hrudníku (obr. 14) je další základní kritérium pro stanovení diagnózy plicní tuberkulózy. Vedle přehledného snímku hrudníku je potřeba provést také hloubkové snímky zaměřené na hilovou oblast pro důkaz případně zvětšených lymfatických uzlin. Je to velmi nezbytné zejména u kojenců a batolat, kde je hilová oblast překryta relativně širokým centrálním stínem. (Křepela, 2007)



Obrázek 14 Rentgen hrudníku před (a) a po léčbě (b)

Rentgen hrudníku na obrázku 14a ukazuje oboustranný fluidothorax (pleurální výpotek), infiltraci plicního parenchymu a známky plicní kongesce (překrvení). Zánětlivá ložiska na snímku jsou znázorněna bílým zastíněním. Obrázek 14b pak ukazuje snímek hrudníku po léčbě kombinací léků, kdy došlo k výraznému zlepšení stavu.

zdroj: Fernandová, 2019

Radiologický nález plicní TBC bývá charakteristický, ale nikoliv specifický. Zadopřední a boční skiagram hrudníku je základním vyšetřením u plicní i mimoplicní formy. Typickou lézí jsou stíny s projasněním a diseminace nodulárních stínů, případně rozsáhlejší

plošné zastínění. V případě mimoplicní TBC se pak používají zobrazovací techniky pro identifikaci lézí v postižených oblastech dle klinického nálezu (např. počítačová tomografie a magnetická rezonance mozku, kostí, měkkých tkání nitrobřišních orgánů, ultrasonografické vyšetření ledvin a uzlin, kolonoskopie). (Vašáková, 2016)

5.2.6 Laboratorní diagnostika

5.2.6.1 Materiál

Základem kvalitního mikrobiologického vyšetření je správně provedený odběr vhodného biologického materiálu a jeho správný transport do laboratoře v chladících boxech. Materiál se, pokud možno, odebírá před nasazením antituberkulotické léčby. Při podezření na tuberkulózu jsou odebírány různé biologické materiály. U respiračních a plicních forem se odebírá sputum, případně indukované sputum. Odběr se provádí před jídlem a hygienou ústní dutiny. Dále lze odebrat bronchoalveolární laváž, pleurální výpotek nebo laryngeální výtěr. Při podezření na meningitidu se odebírá mozkomíšni mok, při rozšíření TBC do urogenitálního traktu pak střední proud moči, případně prostatický sekret, ejakulát nebo menstruační krev. Pro vyšetření mohou být též odebrány žaludeční obsah, stolice, stěry z hnisavých ran a píštělí, pevné tkáně i krev. (Ptáková, 2011)

5.2.6.2 Mikroskopie

Přímá mikroskopie se opírá o charakteristické morfologické vlastnosti mykobakterií. Mikroskopický průkaz je základní vyšetřovací metodou pro většinu odebraných vzorků, zejména pak pro sputum. Nález mykobakterií ve sputu signalizuje rozsáhlá, klinicky i epidemiologicky závažná onemocnění. Z metodologického hlediska jde o poměrně specifickou techniku, protože k získání pozitivního nálezu je potřeba, aby v 1 mm³ bylo aspoň 10⁵ mykobakterií. (Bednář, 1996)

Mikroskopické vyšetření umožňuje prokázat přítomnost acidorezistentních tyček přímo v odebraných materiálech pomocí barvených mikroskopických preparátů (Ziehl-Neelsen, fluorescenční barvení) během několika málo hodin. (Ptáková, 2011)

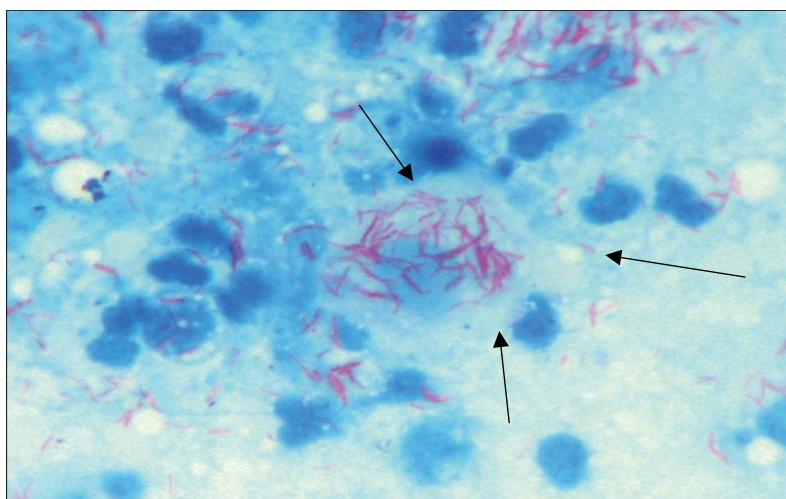
Preparát se hodnotí většinou při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Po odečtení každého nátěru se vždy otírá objektiv mikroskopu suchou gázou, aby nedocházelo k přenosu acidorezistentních tyčinek do sousedních preparátů. Odečtená sklíčka se zbaví imerzního oleje ponořením do xylenu. Výhodou mikroskopie ve srovnání s dlouhodobou kultivací je při podezření na tuberkulózu její rychlost. Mikroskopie však nikdy nesmí kultivaci nahrazovat,

pouze ji doplňuje. Je totiž daleko méně citlivá. Pokud má ale pacient sputum mikroskopicky pozitivní na acidorezistentní tyčky, jedná se s velkou pravděpodobností o přítomnost mykobakterií. (Votava, 2010)

5.2.6.3 Barvení

Mykobakterie se pro přítomnost velkého množství lipidů v buněčné stěně nebarví klasickým postupem dle Grama. Vzácně v hustých preparátech barvených dle Grama spatříme negativně znázorněné nezbarvené stíny mykobakterií.

Klasickou metodou barvení acidorezistentních tyčinek je metoda dle Ziehl-Neelsena (obr. 15), která spočívá v barvení karbolfuchsinem za horka, v diferenciaci kyselým alkoholem a v dobarvení methylenovou modří nebo malachitovou zelení. Preparát z klinického vzorku se pozoruje pečlivě, při zvětšení 1000x se vyšetřuje asi 50 zorných polí meandrovitě v pěti různých místech nátěru. Obarvené acidorezistentní tyčinky jsou růžové až červené na modrém nebo zeleném pozadí, štíhlé, dlouhé několik μm , někdy nepravidelné a zrnité.



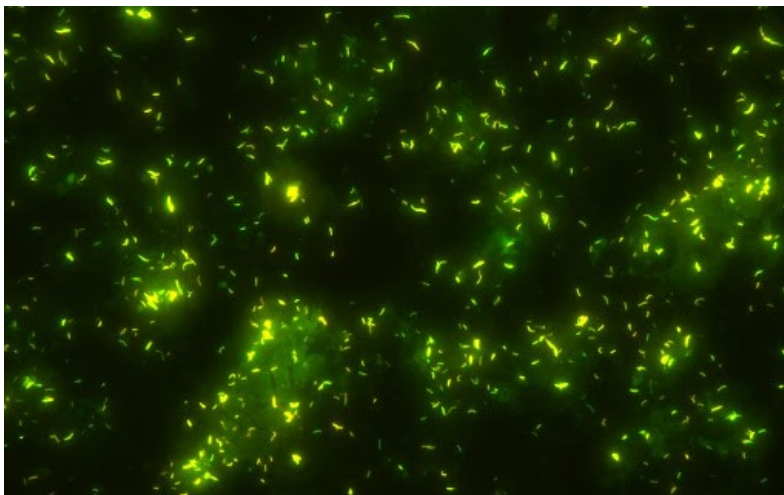
Obrázek 15 *M. tuberculosis* v preparátu barveném dle Ziehl-Neelsena

Šipky ukazují na červené (až růžové) acidorezistentní tyčinky na modrém pozadí. Zvětšeno 1000 \times .

zdroj: https://www.atmph.org/viewimage.asp?img=AnnTropMedPublicHealth_2011_4_2_110_85763_f3.jpg

Fluorescenční barvení (obr. 16) se provádí směsí auraminu O s rhodaminem, je výhodnější, protože se výsledek odečítá při menším zvětšení. Jen podezřelé žlutobílé útvary v pozadí se vyšetřují imerzí. Pokud v předepsaném počtu zorných polí není žádná acidorezistentní tyčinka, nebo nanejvýš 4, považuje se nález za negativní. Při nálezu 5 až 20 tyčinek v prohlédnutých 50 polích preparátu se nález hodnotí jedním křížkem. Dva křížky

znamenaají četné acidorezistentní tyčinky (21 až 100), tři křížky pak velmi četné tyčinky (více než 100). (Votava, 2010)



Obrázek 16 Fluorescenční barvení M. tuberculosis

Při fluorescenčním barvení jsou mykobakterie jasně svítící zelené (nebo žluté) tyčinky na černém pozadí. Barveno směsí auraminu O s rhodaminem. Zvětšení 400×.

zdroj: <http://www.m-shot.com/index.php?a=show&m=Anlie&id=94>

Fluorescenční barvení má vyšší citlivost než barvení dle Ziehl-Neelsena a zabere méně času, ale omezení představují vysoké finanční náklady na provoz, zejména na rtuťové zdroje světla (rtuťové výbojky). Další nevýhodou jsou vysoké nároky na pravidelnou údržbu a potřeba tmavé místnosti. Byla vyvinuta technologie stabilní světelné diody (LED), která výrazně snižuje náklady, protože není tak finančně náročná jako rtuťový zdroj světla. Navíc lze preparát pozorovat okamžitě, aniž by se čekalo na zahřátí výbojky. Použití LED diod je samozřejmě šetrnější k životnímu prostředí než klasické řešení s rtuťovou výbojkou. Světová zdravotnická organizace doporučuje, aby se používala technologie LED a aby byla tato technologie zavedena jako alternativa pro světelnou mikroskopii. (Cuevas, 2011; Talbot, 2015)

5.2.6.4 Kultivace

Kultivační vyšetření je vysoce specifické s až 100násobně vyšší analytickou citlivostí v porovnání s mikroskopií, protože teoreticky dovoluje pomnožení jedné životaschopné buňky do velikosti makrokolonie. Nález i jedné mykobakterie je třeba hodnotit, akceptovat a povinně hlásit. (Liptáková, 2019)

Sputum a ostatní klinické vzorky obsahují také jiné druhy bakterií a mykologická agens, které by při kultivaci mykobakterií rychle přerostly. Musí se tedy předem odstranit.

Dekontaminační metody využívají rezistenci mykobakterií ke kyselinám, alkáliím a některým dezinfekčním prostředkům. Například při Petroffově metodě se sputum mísí se 4% hydroxidem sodným (NaOH) a po asi 15-30 minutách se neutralizuje přidáním fosforečnanu sodného a zcentrifuguje se. Další metodou dekontaminace je použití 1-2% NaOH s přidavkem mukolytického činidla *N*-acetyl-L-cysteinu (NALC) nebo povrchově aktivní látky laurylsulfátu sodného. Postup všech těchto metod je velmi podobný. V prvním kroku se ke vzorku přidá stejný objem dekontaminačního činidla (NALC-NaOH, laurylsulfát-NaOH) a asi 30 minut se vzorek homogenizuje. Následuje neutralizace přidáním vhodného činidla (fosfátový pufr, HCl) a centrifugace. Vzniklý sediment se naočkuje na vhodné kultivační medium. Mozkomíšni mok a další vzorky, které nejsou kontaminovány, se očkují přímo bez předchozího zpracování. Při podezření na masivní kontaminaci vzorku pseudomonádami se využívá dekontaminace kyselinami, zejména kyselinou sírovou (0,5M H₂SO₄) nebo kyselinou šťavelovou (3% C₂H₂O₄). (Greenwood, 1999; Čermák, 2014)

Na kultivaci se používají jednak pevné půdy vaječné, a to půda Löwensteinova-Jensenova (obr. 17) a půda Ogawova, tak i tekuté půdy Šulova, Middlebrook 7H9 a další komerčně dostupné bujóny. Dají se využít i pevné půdy Middlebrook 7H10 a 7H11. Půda Löwensteinova-Jensenova obsahuje kromě některých solí ještě asparagin, glycerin, škrob, roztřepaná vejce a malachitovou zeleň. Rozplňuje se do vysokých zkumavek a nechá se zatuhnout v ušikmené poloze s využitím proudící páry v Arnoldově přístroji. Takto správně připravená půda by měla mít nazelenalou barvu se zrcadlově lesklým povrchem. Ogawova půda obsahuje místo asparaginu glutamát a její příprava je o něco snazší. Šulova půda obsahuje mimo jiné L-alanin a glycerin a je obohacena kaseinovým hydrolyzátem a hovězím sérem. Dodává se komerčně jako 10násobný koncentrát. (Votava, 2010; Čermák, 2014)



Obrázek 17 **Růst *M. tuberculosis* na Löwensteinově-Jensenově půdě**

Na obrázku jsou patrné nažloutlé, drsné květákovité či bradavičnaté kolonie *M. tuberculosis* po 5 týdnech kultivace při teplotě 37 °C.

zdroj: <http://www.bacteriainphotos.com/Mycobacterium%20tuberculosis.html>

Půdy se očkují sterilní pipetou 2 kapkami sedimentu a uzavrou se gumovou zátkou. Pro zkrácení lag-fáze (klidové fáze) mykobakterií se první týden nesmí půdy těsně uzavírat a ukládají se v atmosféře se zvýšeným obsahem CO₂. Půdy se inkubují při 37 °C pro každý vzorek spojené do svazku gumičkou. Půdy se odečítají za 1,3,6 a 9 týdnů. Po 1 týdnu se někdy zachytí rychle rostoucí mykobakterie, odečítání za 3 týdny může zachytit i další. Pozitivní výsledek se sdělí, zachycené kmeny se začnou určovat a založí se vyšetření citlivosti, zbytek se nechá inkubovat dále. Po 6 týdnech se vyšetření uzavírá a rozesílají se pozitivní i negativní nálezy. Po 9 týdnech se oznámí jen pozitivní nálezy a kultivace se ukončí. Na pevných půdách vyrůstá *M. tuberculosis* v nažloutlých, drsných květákovitých či bradavčitých koloniích s nepravidelným okrajem a drolivou konzistencí. (Votava, 2010)

Zrychlené automatizované kultivační systémy jsou založené na hodnocení metabolických produktů životaschopných mykobakterií. Jsou schopné zachytit už začínající fázi množení. Protože obsahují i růstový faktor, urychlují kultivační proces asi o 14 dní. Mají vyšší záchyt než klasická kultivace, proto ji často doplňují. Jsou vhodné i na testování citlivosti na antituberkulotika. (Liptáková. 2019)

Děje se tak např. buď na základě snížení množství kyslíku v médiu, což umožní, aby indikátor začal po ozáření UV-světlem fluoreskovat, nebo na základě uvolňování CO₂, na což reaguje kolorimetrický sensor v přístroji. (Votava, 2010)



Obrázek 18 Radiometrický kultivační systém BACTEC 460 TB

zdroj: <https://www.bidspotter.com/en-us/auction-catalogues/bscbo1/catalogue-id-bscbo110019/lot-688b6a9a-7ba3-43a8-959f-a497012a94b2>

BACTEC 460 TB (obr. 18) je velmi používaný růstový systém založený na radioaktivně značeném ^{14}C bujónu, ve kterém probíhá detekce vznikajícího $^{14}\text{CO}_2$ při mykobakteriální metabolizaci ^{14}C bujónu. BBL MGIT 960 (obr. 19) je kultivační metoda založená na bujónu Middlebrook 7H9 s fluorescenčním senzorem citlivým na kyslík k indikaci růstu. (Talbot, 2015)



Obrázek 19 Kultivační systém BBL MGIT 960

zdroj: <https://www.trios.cz/pristroje/becton-dickinson/bd-bactec-mgit/>

5.2.6.5 Genetické metody

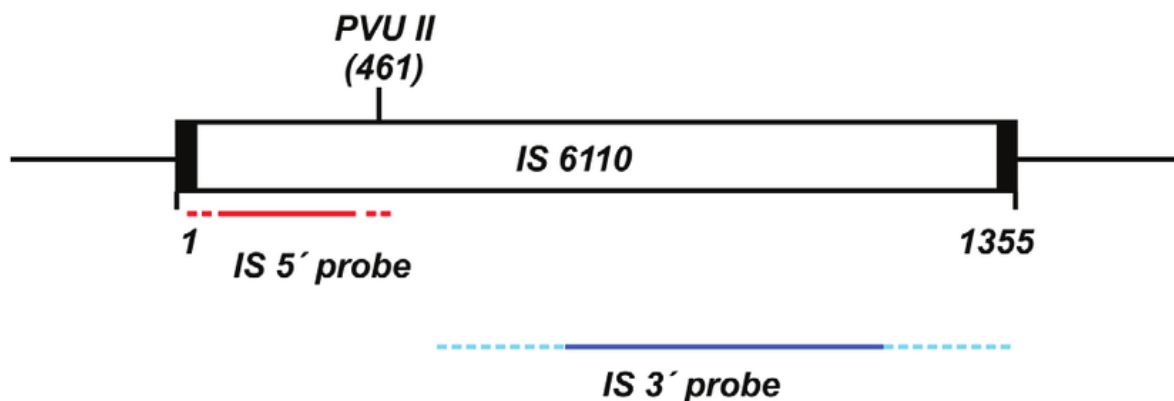
Moderní molekulární genetické metody jsou založené na detekci specifických nukleových kyselin (NK) typických pro konkrétní mykobakterie. Jsou to velmi rychlé metody

průkazu, protože lze řádově v rozmezí několika hodin prokázat přítomnost přímo v odebraném biologickém materiálu. Jedná se o *Mycobacterium tuberculosis* Direct (MTD) testy nebo polymerázovou řetězovou reakci (PCR). V případě pozitivity tyto testy prokazují specifické úseky NK pomocí značených genetických sond, které jsou komplementární k hledanému úseku NK.

Pomocí molekulárních metod lze detekovat genetický materiál jak ze živých, tak i z mrtvých mykobakterií, proto je toto vyšetření vždy nutné doplnit kultivací, která prokáže jen živé mykobakterie, neboť jenom živé mykobakterie mohou vyvolat onemocnění. Narostlé mikroorganismy jsou identifikovány právě genetickými metodami (genotypizace, sekvenční analýza). Tyto metody umožňují určit *M. tuberculosis* komplex i další netuberkulózní mykobakterie. Bakteriologická identifikace hraje významnou roli při určení etiologie onemocnění. (Ptáková, 2011)

Na pozitivitu testu MTD stačí přítomnost jedné mykobakterie v 1 ml vzorku. Negativní výsledek genetických metod však nevylučuje možnost tuberkulózní etiologie onemocnění. Úspěšnost průkazu do značné míry ovlivňuje kvalita vzorku a faktory inhibice, proto je nutné současně vykonat mikroskopické i již zmíněné kultivační vyšetření. Pozitivní výsledek se musí posuzovat komplexně, s využitím všech dostupných diagnostických kritérií. K identifikaci mykobakterií se kromě PCR mohou využít i další metody, např. southern-blot testy, fingerprinting, hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) nebo sekvenování. (Liptáková, 2019)

Existuje mnoho komerčních souprav založených na genetických metodách. Například AMTD (z angl. *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct test*) amplifikuje podjednotku ribozomu 16S rRNA pomocí izotermické reakce a poté ji hybridizuje se sondami specifickými pro *M. tuberculosis*, které detekuje pomocí chemiluminiscence. Test Cobas Amplicor amplifikuje 16S rRNA pomocí PCR, hybridizuje se sondami a provádí detekci pomocí kolorimetrie. Další příkladem komerční soupravy je systém DTB (PB ProbeTec ET Direct TB), který amplifikuje dva cíle, 16S rRNA a mykobakteriální sekvenci IS (inzerční sekvence) *6110* (obr. 20), pomocí izotermické enzymatické reakce s fluorescenční detekcí. Komerční genetické soupravy umožňují i rychlou detekci genů zapojených do rezistence mykobakterií. (Vinuelas-Bayón, 2017)



Obrázek 20 Schématické znázornění mykobakteriální sekvence IS 6110

Obrázek ukazuje inzerční sekvenci IS 6110, přítomnou v genomu *M. tuberculosis*. Tato sekvence je štěpitelná endonukleázou Pvu II, čímž se získají dva fragmenty, které se používají jako sondy (probe) v genotypizačních studiích IS 6110. Pvu II je endonukleáza purifikovaná z kmene *Escherichia coli*, který nese gen Pvu II z *Proteus vulgaris*.

zdroj: De Almeida, 2019

5.2.6.6 MALDI-TOF

Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI) s detektorem doby letu (TOF) je nástrojem pro rychlou a spolehlivou identifikaci mikroorganismů analýzou proteinových profilů buď z narušených buněk, nebo z intaktních bakteriálních buněk. Bakteriální kolonie jsou přeneseny z kultivačních médií, smíchány s přebytkem UV absorbující matrice a sušeny na ocelových deskách (terčích). Vysušené vzorky jsou poté vystaveny laserovým pulzům v přístroji, dochází k přenosu energie z matrice na molekuly analytu s desorpcí analytu do plynné fáze a urychlování elektrickými potenciály letovou trubicí do hmotnostního spektrometru, přičemž separace je určena jejich poměrem hmotnosti a náboje m/z . Získaný profil je porovnáván s profily organismů obsažených v databázi.

MALDI-TOF již byl přizpůsoben pro rutinní identifikaci mykobakterií pomocí standardních protokolů pro přípravu vzorku a standardních přístupů pro kvantifikaci reprodukovatelnosti. Tato technika umožňuje snadnější, levnější a rychlejší diagnostiku mykobakteriálních patogenů ve srovnání s konvenčními metodami. Navíc se ukazuje, že i rychlá detekce antimikrobiální rezistence je jednou z budoucích aplikací této techniky. (Zhang, 2014)

5.2.6.7 Vyšetření citlivosti

Stanovení citlivosti na základní antituberkulotika se provádí u všech nových případů onemocnění TBC, potvrzených bakteriologicky, a u rezistentních kmenů. Mezi základní antituberkulotika patří streptomycin, isoniazid, rifampicin, etambutol a pyrazinamid. V případě potřeby se vyšetřuje citlivost i na ethionamid, kanamycin, amikacin, ciprofloxacín nebo cykloserin. (Votava, 2010)

Metody testování citlivosti na antimikrobiální látky jsou dnes založené na dilučních metodách. Diskový difúzní test se pro pomalý růst mykobakterií nepoužívá. Při testování citlivosti se nejčastěji používá tzv. proporční test na Löwenstein-Jensenově půdě. V tomto testu se mykobakterie naočkují na médium obsahující antituberkulotikum v kritické koncentraci, která je přesně definovaná pro každé testované léčivo. Paralelně se očkují i na půdu bez něho. Po vytvoření kolonií na půdě bez antituberkulotika se spočítají kolonie vyrostlé na půdě s ním a spočítá se podíl rezistentních mykobakterií. Jestliže je podíl větší než 1, kmen se hodnotí jako rezistentní vůči testované látce, jakmile je méně než 1, považuje se kmen za citlivý a léčivo se může doporučit pro léčbu. Test se hodnotí po 28 dnech, v některých případech se inkubace prodlužuje o 14 dní. Zkrátit čas umožňují automatické systémy založené na použití tekutých médií. (Liptáková, 2019)

Výsledek vyšetření citlivosti je vodítkem ošetřujícího lékaře při výběru antituberkulotika pro léčebné nebo profylaktické účely. Obecně se rozlišují 3 kategorie citlivosti. Kategorie citlivý (zkratka C nebo S) ukazuje, že infekce vyvolaná vyšetřovaným kmenem může být účinně léčena doporučeným dávkováním léčiva, pokud neexistuje žádná jiná kontraindikace. Do kategorie intermediární (zkratka I) se zařazují izoláty s hodnotou minimální inhibiční koncentrace (MIC), která se blíží koncentracím obvykle dosažitelným v krvi a tkáni, a u nichž odpověď na terapii může být variabilní. MIC je definována jako nejnižší koncentrace inhibující viditelný růst. Poslední kategorie je rezistentní (zkratka R), ve které nejsou kmeny inhibovány koncentrací léčiva obvykle dosažitelnou v místě infekce nebo mají specifické mechanismy rezistence. Terapie v tomto případě s vysokou pravděpodobností selže. (Scharfen, 2013)

5.2.6.8 Nepřímé diagnostické testy

Pokud jde o nepřímý důkaz tuberkulózy, tak sérologická diagnostika není zatím stále prakticky použitelná. K průkazu specifické buněčné imunity slouží již dříve zmíněný tuberkulinový test, kterým se dokazuje pozdní přecitlivělost vůči antigenu *M. tuberculosis*.

V posledních letech se ale objevila možnost testovat specifickou buněčnou imunitu u TBC i jinak. (Votava, 2010)

Na trh se dostaly tzv. IGRA testy (*Interferon Gamma Release Assay*), které slouží ke sledování produkce interferonu gama ($\text{INF } \gamma$) aktivovanými pomocnými T_{H1} lymfocyty pacienta po jejich stimulaci specifickými antigeny *M. tuberculosis* a měření množství jimi produkovaného $\text{INF } \gamma$ ve vzorku krve. V současnosti se využívají jako náhrada tuberkulinového testu. Jedná se o *in vitro* diagnostický test, který využívá heparinizovanou lidskou krev. Test zahrnuje 16-24hodinovou inkubaci krve s antigeny (ESAT-6, CFP-10) *M. tuberculosis* a s kontrolním mitogenem. Po inkubaci následuje detekce uvolněného $\text{INF } \gamma$ pomocí sendvičového ELISA testu. Test dosahuje 98% specifity a 89% senzitivity pro aktivující se tuberkulózní onemocnění, přičemž umí odlišit latentní formu od překonané infekce. (Liptáková, 2019)

Nejznámější IGRA test je QuantiFERON®-TB Gold (obr. 21), který používá proteinové antigeny specifické pouze pro *M. tuberculosis* a přítomné též u *M. kansasii*, *M. marinum* a *M. szulgai*. U ostatních mykobakterií přítomné nejsou. (Ptáková, 2011)



Obrázek 21 Testovací sada QuantiFERON®-TB Gold

zdroj: Boyle, 2017

5.2.6.9 Histopatologické vyšetření

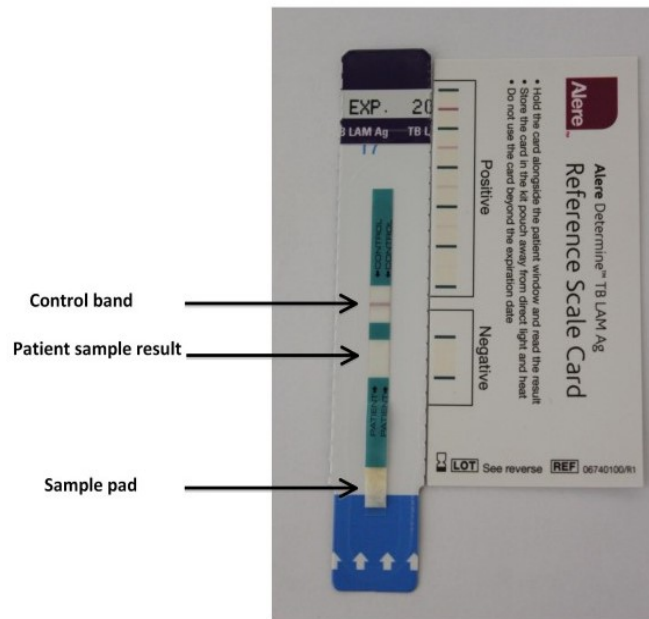
Nápomocné může při diagnostice být i histopatologické vyšetření vzorku plic, pohrudnice, uzlin nebo jiné tkáně získané chirurgickou, bronchoskopickou nebo punkční biopsií. Toto vyšetření prokazuje v typických případech epiteloidní granulom, občas s probíhající nekrózou. (Vašáková, 2016)

5.2.6.10 Ramanova spektroskopie a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

Techniky Ramanovy spektroskopie (RS) a povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) jsou rychlé a účinné nástroje pro detekci proteinových markerů a jejich konformačních změn. RS je technika spektroskopického rozptylu založená na neelastickém rozptylu fotonů z molekul vzorku po dopadu primárního záření. SERS je navíc vylepšena o amplifikaci signálu RS připojením molekul vzorku k povrchu zvyšujícímu signál. RS a SERS aplikované na vzorky krve již byly použity v mnoha studiích k diagnostice nejrůznějších onemocnění (např. horečka dengue, rakovina nebo Alzheimerova choroba). Tato technika bývá v posledních letech používána i při diagnostice TBC. Latentní TBC infekce může být detekována jak RS, tak SERS. Byla prokázána vysoká reprodukovatelnost těchto metod pro detekci proteomických spekter u pacientů s TBC a použitelnost pro diagnostiku TBC, zejména diagnostiku latentní infekce a diferenciaci mezi aktivní TBC a latentní TBC. Tyto metody by mohly v budoucnu nahradit tuberkulinové testy a IGRA testy. (Kaewseekhao, 2020)

5.2.6.11 LAM test

Detekce mykobakteriálních lipoarabinomananů (LAM) je alternativní imunochromatografický test s použitím vzorku moči, tedy vzorku, který lze snadno získat. LAM je tepelně stabilní glykolipid buněčné stěny mykobakterií a je uvolňován metabolicky aktivními bacily, takže jej lze použít pro detekci TBC. Protože je LAM filtrován ledvinami, je detekovatelný v moči, zejména pak u pacientů s pokročilou infekcí HIV a diseminovanou TBC. U pacientů s počtem $CD4^+$ T-buněk méně než $50/mm^3$ má test značně vysokou citlivost a specificitu. LAM test (obr. 22) tedy může zlepšit detekci TBC u imunokompromitovaných pacientů s pokročilým HIV a může být použit jako doplňkový diagnostický nástroj. Test LAM v moči je atraktivní metodou kvůli jeho snadnému použití, lze provést kdekoli a jeho provedení trvá zhruba jen 20 minut. (Suwanpimolkul, 2017)



Obrázek 22 **Imunochromatografický LAM test**

Control band – kontrolní proužek, Pacient sample result – výsledek vzorku pacienta, Sample pad – místo pro nanesení vzorku

Na obrázku vidíme negativní výsledek LAM testu, protože se v zóně výsledku nenachází specifický proužek. Čtení výsledku lze usnadnit porovnání s referenční kartou (vpravo). Přítomnost pruhu v zóně výsledku podobné nebo větší intenzity jako nejslabší pozitivní na referenční kartě naznačuje přítomnost LAM v moči.

zdroj: Lawn, 2012

5.2.7 Terapie

Mykobakterie jsou přirozeně rezistentní na většinu používaných antimikrobiálních látek, proto je nutné léčit TBC speciálními přípravky, antituberkulotiky. První zvláštností terapie tuberkulózy je kombinovaná terapie za použití obvykle čtyř antituberkulotik, klasicky isoniazidu, rifampicinu, etambutolu a pyrazinamidu, kterou se předchází vzniku rezistence. Druhou zvláštností je pak dlouhodobá terapie trvající déle než 6 měsíců, která je nezbytná k likvidaci těchto pomalu rostoucích intracelulárních parazitů. (Talbot, 2015; Goering, 2016)

Terapeutické režimy tuberkulózy se rozdělují do 4 skupin, podle lokalizace, rozsahu onemocnění a bakteriologického nálezu. První skupina se volí u pacientů s novou a potvrzenou tuberkulózou. Druhá při opakované tuberkulóze, přerušené nebo neúspěšné léčbě. Třetí skupinu pak volíme při neověřené či mimoplicní formě tuberkulózy a čtvrtou při ostatních případech. (Liptáková. 2019)

Antituberkulotika se klasifikují do tří skupin, baktericidní látky (rifampicin, pyrazinamid) jež účinně sterilizují tuberkulózní ložisko, baktericidní látky (isoniazid, streptomycin, etambutol), které mykobakterie pouze za určitých podmínek usmrcují, a látky s bakteriostatickým účinkem (ethionamid, prothionamid, thioacetazon nebo cykloserin). Poslední 3 látky z poslední jmenované skupiny se v současnosti v terapii prakticky nepoužívají. (Greenwood, 1999)

Na léčbu se v současnosti používá nejčastěji již zmíněná základní čtyřkombinace léků první linie (tab. 2), isoniazidu, rifampicinu, etambutolu a pyrazinamidu v průběhu prvních 2 měsíců s přechodem na udržovací léčbu po dobu dalších 4-6 měsíců, nejčastěji dvojkombinací isoniazidu a rifampicinu. Léky druhé linie (fluorochinolony, amikacin, ethionamid, cykloserin, kapreomycin) se používají tehdy, pokud se během podávání léků první linie objeví rezistence nebo toxicita. Profylakticky se nejčastěji volí monoterapie isoniazidem po dobu 6-9 měsíců, respektive rifampicinem 4 měsíce. V ojedinělých případech je to profylaxe etambutolem nebo pyrazinamidem po dobu 12 měsíců. Streptomycin se používá pouze u rezistentních kmenů TBC, při recidivách, a ještě u TBC centrální nervové soustavy. Základní léčba tuberkulózy začíná hospitalizací nemocného na infekčním oddělení. Následně pokračuje ambulantně, což znamená, že pacient chodí na kontroly ke spádovému pneumoftizeologovi. Celková doba léčby se pohybuje od 6 do 12 měsíců, konkrétní léčba závisí na stavu nemocného, rozsahu nemoci a compliance pacienta. (Talbot, 2015; Wallenfels, 2018; Liptáková. 2019)

Tabulka 2 Přehled antituberkulotik

1. linie	2. linie	3. linie
Isoniazid	Aminoglykosidy (amikacin)	Rifabutin, rifapentin Bedachilin, delamanid
Rifampicin	Polypeptidy (kapreomycin, viomycin, enviomycin)	Makrolidová antibiotika
Pyrazinamid	Fluorochinolony (ciprofloxacin, levofloxacin)	Linezolid
Etambutol	Thioamidy (ethionamid, prothionamid)	Klofazimin
(Streptomycin)	Cykloserin, terizidon	Thioacetazon, thioridazin

Poznámka: Rifabutin a rifapentin v současné době už někde mohou nahrazovat rifampicin. Bedachilin a delamanid jsou léčiva vyhrazená pro léčbu plicní multirezistentní TBC. (Součková, 2016; Peek, 2020)

zdroj: Liptáková, 2019

Compliance znamená ochotu pacienta dodržovat lékařské pokyny a režimy. Protože se může u různých pacientů značně lišit, může mít významný vliv na výsledky léčby. Vliv zde mají individuální a sociální faktory pacientů. Dodržování v širším smyslu může také zahrnovat změny vyžadované (např. v reakci na zvýšené testy jaterních funkcí), které nejsou aktivní volbou pacienta. V mnoha studiích bylo prokázáno, že právě *compliance* je hlavním zdrojem variability ovlivňující výsledek terapie TBC. (Vernon, 2019)

Celé období antimikrobní léčby se dělí na 2 fáze. Iniciální fáze léčby má pomocí kombinované chemoterapie dosáhnout redukce bakteriální populace a debacilizace pozitivních pacientů. Má zabránit selekci rezistentních kmenů a dosáhnout ústupu klinických známek aktivity tuberkulózního procesu a počínajícího ústupu rentgenového nálezu u plicní formy. Tato fáze trvá většinou zmíněné 2 měsíce. Pokračovací fáze léčby má za cíl usmrcení zbývajících mykobakterií, které zůstaly v tuberkulózních lézích a mohly by tak vést k recidivě onemocnění. Tato fáze trvá většinou zmíněných 4-6 měsíců a probíhá ambulantně. (Křepela, 2007; Bártů, 2008)

I přes veškeré tyto zásady se však stále zvyšuje výskyt rezistentních kmenů na antituberkulotika první linie, což vedlo zdravotnické organizace k monitorování jejich výskytu a obnovilo zájem o výzkum a výrobu nových preparátů. Monorezistence je rezistence pouze na jeden lék první linie, polyrezistence je rezistence na více než jeden lék první linie (na jiný než isoniazid a rifampicin). Multirezistence MDR (z angl. *multidrug resistant*) znamená rezistenci nejméně vůči isoniazidu a rifampicinu. Rozsáhle rezistentní kmeny, označované jako XDR (z angl. *extensively drug resistant*), byly hlášeny z Asie, Ameriky i Evropy. Jedná se kromě rezistence na více léků o rezistenci na jakýkoliv fluorochinolon a alespoň na jedno ze tří injekčních antituberkulotik 2. linie (kapreomycin, kanamycin a amikacin). U TBC se řeší ještě RR rezistence, což je rezistence na rifampicin, která zahrnuje jakoukoliv rezistenci na rifampicin ve formě multirezistence, polyrezistence, MDR či XDR. Je pravděpodobné, že se nejedná jen o jeden kmen, ale rezistence vzniká na mnoha různých místech v důsledku chybného vedení léčby, zejména nedodržování zásad a špatného předepisování léků. Proto je nezbytné určit nové zásady zjišťování rezistentních kmenů, zavádět nová antituberkulotika a strategie omezující přenos infekce. (Goering, 2016; WHO, 2020)

Průlomovým krokem v léčbě byl objev a registrace nových antituberkulotik, bedachilinu a delamanidu, které by měly být účinné jak u citlivých, tak u multirezistentních kmenů, a zřejmě omezeně i u extenzivně rezistentních mykobakteriálních kmenů. Nevýhodou

je však jejich vysoká cena. Do konce roku 2017 hlásilo použití bedachilinu 68 a delamanidu 42 států a teritorií. V současnosti to bude určitě ještě více. (Wallenfels, 2018)

Závažné nežádoucí účinky vedoucí ke změně léčby se vyskytují u 4 % až 9 % pacientů, kteří jsou léčeni klasickou čtyřkombinací léků. Většina nepříznivých účinků je však mírnějších. Patří sem gastrointestinální nežádoucí účinky (nauzea, zvracení) nebo exantém. Léčba těchto nežádoucích účinků by měla být zpočátku symptomatická. Těžká jaterní toxicita (mnohonásobné zvýšení jaterních transamináz) se vyskytuje u 2,4 % případů a může vyžadovat dočasné přerušení léčby. Léky proti TBC jsou celosvětově jednou z běžných příčin hepatotoxicity. Jakmile hladiny transamináz dosáhnou normálu, lze postupně nasadit zmíněná čtyři antituberkulotika, což umožňuje identifikaci toxického léčiva u konkrétního pacienta. Tuto látku lze poté nahradit jinou vhodnou látkou. Pro včasné odhalení vzácných případů neuromu optického nervu, které se mohou vyskytnout u pacientů užívajících etambutol, je doporučováno oftalmologické vyšetření ve 4týdenních intervalech. Neurologické komplikace (neuropatie a psychóza) jsou stejně vzácné a mohou se vyskytovat u rizikových pacientů (např. s nedostatkem pyridoxinu, u žen v těhotenství), kteří dostávají isoniazid. Zabránit jim lze podáváním pyridoxinu společně s isoniazidem. Pyrazinamid pravidelně způsobuje zvýšení hladiny kyseliny močové v séru. (Suárez, 2019)

Důležité je objevovat a vyvíjet nové léky, které mohou zlepšit strategii léčby, zvýšit její bezpečnost a řešit jak infekci, tak i vedlejší účinky. Pozornost je věnována i rostlinným přírodním produktům kvůli jejich chemické rozmanitosti. Léčivé rostliny jsou darem přírody, který se od nepaměti používá k léčení mnoha chorob u lidí. Podle odhadů WHO spoléhá až 80 % populace v rozvojových zemích na tradiční přírodní léky v rámci primární zdravotní péče. Použití extraktu léčivých rostlin má velký význam pro léčbu různých onemocnění, včetně TBC. Tradičně používané léčivé rostliny a jejich části, např. kořen *Calpurnia aurea*, semena *Ocimum basilicum*, listy *Artemisia abyssinica* nebo *Eucalyptus camaldulensis*, mají antituberkulotický potenciál *in vitro*. V případě jaterního poškození rostlinný extrakt zabraňuje poškození buněk a může významně obnovit normální hladinu jaterních enzymů. Mnoho studií zmiňuje hepatoprotektivní účinky glykosidů, flavonoidů, triterpenů a fenolických sloučenin z extrahovaných rostlin. Kombinace cílových specifických vlastností léku proti TBC s mnoha zdravotními přínosy léčivých rostlin by tedy mohla být pozitivním východiskem pro zvládnutí tuberkulózy a souvisejících vedlejších účinků. (Mangwani, 2020)

5.2.7.1 Chemoprofylaxe

V oblastech s malým výskytem tuberkulózy je snaha nahradit imunizaci chemoprofylaxí. K ní se doporučuje preventivní podávání isoniazidu (INH) osobám s prokazatelným blízkým kontaktem s nemocnými tuberkulózou po dobu jednoho roku. Tato chemoprofylaxe je také doporučována u osob, u nichž byla prokázána konverze negativního kožního testu na pozitivní. V těchto případech se však jedná spíše o časnou léčbu subklinické infekce než o profylaxi. (Goering, 2016)

Americká hrudní společnost a CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) zkoumali řadu profylaktických režimů pro použití u pacientů, HIV pozitivních i HIV negativních, vystavených *M. tuberculosis*. Doporučené režimy zahrnují denně nebo dvakrát týdně podávání INH po dobu 6 až 9 měsíců, nebo denně podávání RIF (rifampicin) po dobu 4 měsíců. Pacienti, kteří byli vystaveni rezistentní *M. tuberculosis*, by měli dostávat pyrazinamid, a to buď s etambutolem nebo levofloxacinem, po dobu 6 až 12 měsíců. (Murray, 2012)

5.2.8 Prevence a kontrola

Základem kontroly tuberkulózy v oblasti veřejného zdraví je rychlá a účinná léčba pacientů s aktivní (zejména otevřenou) tuberkulózou a pečlivé sledování jejich kontaktů s dalšími lidmi tuberkulinovými testy, rentgenovými snímky a vhodnou léčbou. Léčba asymptomatických, tuberkulin pozitivních osob v nejvíce náchylných věkových skupinách a tuberkulinově pozitivních osob, kteří dostávají imunosupresivní léky, výrazně snižuje reaktivaci infekce. Tyto kroky vedly ke kontrole tuberkulózy. Na konci 80. let však byla tato opatření uvolněna, což mělo za následek zvýšení výskytu onemocnění. (Brooks, 2007; Harvey, 2007)

Aktivní vyhledávání spočívá ve vyhledávání nemocných jednotlivců v domácnostech a na pracovištích, kteří mají chronický kašel, trvající po dobu několika měsíců. Pouhé čekání na pacienty, kteří jdou k lékaři s charakteristickými příznaky, je málo účinné, a to i přes systematické poučování a osvětu. Pravidelné hromadné radiografické vyšetřování osob nezachytí více než asi 15 % nemocných tuberkulózou, a proto se na doporučení WHO běžně nepoužívá. Někdy je ale indikováno v situacích vysokého rizika. Nejdůležitějšími faktory, ovlivňujícími incidenci, jsou faktory socioekonomické, zejména pak snížení počtu osob v domácnostech a v zaměstnání. Předpokládá se, že v zemích třetího světa každý nemocný s otevřenou tuberkulózou může infikovat ročně až 20 osob, kteří jsou s ním v úzkém kontaktu. Zatímco v Evropě a ve vyspělých zemích jsou to asi 2-3 osoby v kontaktu. (Greenwood, 1999)

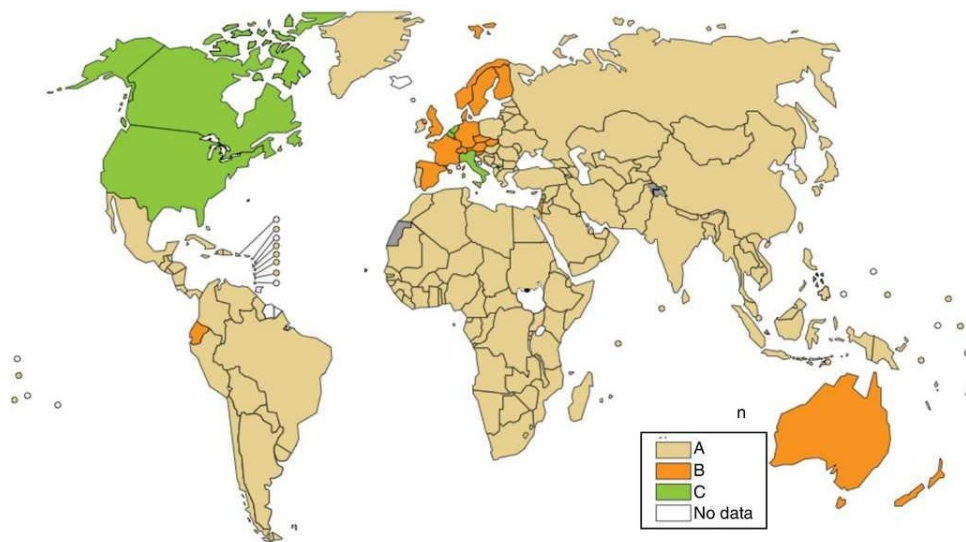
5.2.8.1 Vakcinace

K očkování proti tuberkulóze neboli ke kalmetizaci se používá živá oslabená vakcína BCG (*bacille Calmette-Guérin*), která pochází z *Mycobacterium bovis* oslabeného mnohaletým pasážováním *in vitro*, a očkuje se do kůže novorozenců, v 11 letech se přeočkovává. BCG vyvinuli lékaři Albert Calmette a Camille Guérin v letech 1908 až 1921. BCG vakcína byla v klinickém prostředí představena téměř před 100 lety, v roce 1921, kdy byla orálně podávána dítěti, jehož matka zemřela na tuberkulózu den po narození dítěte. Dítě nemělo žádné nežádoucí účinky v důsledku očkování BCG a nedošlo u dítěte ani k rozvoji tuberkulózy. V této době byla volena orální cesta podání, protože se předpokládalo, že gastrointestinální trakt je přirozenou cestou, při které jsou kojenci a děti, kterým bylo podáváno nepasterizované mléko, infikovány tuberkulózou. Vakcína se tedy novorozencům původně aplikovala perorálně, nyní se dává intradermálně. Jak již bylo zmíněno, v 11 letech se přeočkovává, ale pouze při negativním tuberkulinovém kožním testu dle Mantouxové. Děti, které si zachovaly imunitu po očkování, ale ještě více jedinci, kteří se setkali s infekcí, zůstávají léta přecitlivělí. V místě podání tuberkulinu se u nich vyvine zánětlivá reakce vrcholící za 48 až 72 hodin. Hodnotí se indurace, nikoli erytém. Pokud je test negativní, opakuje se s vyšší dávkou, a očkují se pouze ti, kteří zůstali tuberkulin negativní. Při pozitivním testu se od očkování musí upustit, protože by po podání vakcíny došlo k závažným reakcím. (Votava, 2003; Martin, 2018)

Protektivní účinek BCG vakcíny byl prokázán v četných studiích. Je však různý podle země aplikace. Podle jedné studie má vakcína ve Velké Británii protektivní účinek u 75 % očkovaných školních dětí, podobně jsou na tom i některé státy v USA. Zatímco například v jižní Indii se účinek vakcíny neobjevil. Rozdílný účinek se vysvětluje rozdílnou expozicí obyvatel mykobakteriím v prostředí. Tato expozice má v jedné oblasti protektivní účinek, v jiné naopak navodí nežádoucí imunitní reakce. (Greenwood, 1999)

Očkování BCG vakcínou se běžně provádí v zemích, kde je tuberkulóza endemická a je zodpovědná za významnou morbiditu a mortalitu (obr. 23). Tento postup může vést k výraznému snížení výskytu tuberkulózy ve světě, pokud je vakcína podávána mladým lidem. Bohužel BCG imunizaci nelze provádět u imunokompromitovaných pacientů (například s HIV infekcí). Je tedy velmi nepravděpodobné, že by to bylo užitečné v oblastech s vysokou prevalencí HIV (např. v Africe) nebo pro kontrolu tuberkulózy odolné vůči lékům. V současné době se v mezinárodních imunizačních programech celosvětově nejčastěji používá šest kmenů: BCG Pasteur 1173 P2, BCG Danish 1331, BCG Glaxo 107, BCG Tokyo 172-1, BCG Russia-Ir a BCG Brazil. Vakcíny jsou pojmenovány podle laboratoře nebo země, kde byly

subkultivovány. Protože dříve neexistovaly metody dlouhodobé prezervace mikroorganismů, prováděly jednotlivé laboratoře opakované pasážování, při kterých subkultivovaly původní kmen, což vedlo k různým BCG kmenům s heterogenními fenotypy. (Ho, 2010; Murray, 2012)



Obrázek 23 Dělení zemí na základě doporučení očkování BCG.

Země, kde je BCG zahrnut do očkovacího programu jsou béžové (A). Země, kde v minulosti očkování bývalo, ale již se neprovádí, jsou oranžové (B). Země, kde je BCG uvedeno jen u konkrétních skupin populace, jsou zelené (C).

zdroj: Martin, 2018

V bývalém Československu se zahájilo plošné očkování proti TBC v roce 1953. V 50. letech se pro dosažení rychlé proočkovanosti očkovali jak novorozenci, tak i starší ročníky. Od počátku 60. let až do roku 2009 se provádělo očkování novorozenců a tuberkulin negativních dětí ve věku 11 let. Výjimkou bylo přechodné období v letech 1986-1994, kdy se ve Východočeském, Středočeském a Jihočeském kraji očkovali děti pouze dobrovolně. Z důvodu rostoucího počtu případů tuberkulózy a úmrtí se v dalších letech plošné očkování vrátilo i do těchto krajů. V roce 2009 se ukončilo pravidelné přeočkování tuberkulin negativních dětí ve věku 11 let. Od 1.11.2010 je plošné očkování v České republice ukončeno. (Petráš, 2016)

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této diplomové práce se věnuje testování antimykobakteriální aktivity potenciálních antituberkulotik na kmenech rodu *Mycobacterium* (*M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. tuberculosis*) pomocí mikrodiluční bujónové metody na základě standardů CLSI a EUCAST, vyhodnocení získaných výsledků a jejich interpretace z hlediska účinnosti a vztahu ke struktuře testovaných sloučenin. Testování bylo prováděno v laboratoři na katedře Biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Testované látky byly laskavě poskytnuty od výzkumné skupiny prof. PharmDr. Martina Doležala, Ph.D. z katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy.

6.1 Použité laboratorní chemikálie, materiál a přístroje

6.1.1 Chemikálie

- dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- glycerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- OADC suplement (Himedia, Bombaj, Indie)
- sterilní H₂O (Ardeapharma, a.s., Ševětín, Česká republika)
- sodná sůl resazurinu (Across organics, Geel, Belgie)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

6.1.2 Materiál

- mikropipety, multikanálové pipety (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- laboratorní špičky na pipety (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- mikrotitrační destičky s víčky (Gamedium, spol. s.r.o., Jesenice u Prahy, Česká republika)
- zásobník na reagentie (Brand, Wertheim, Německo)
- plastové zkumavky a eppendorfy (Gamedium, spol. s.r.o., Jesenice u Prahy, Česká republika)
- stojánky na zkumavky
- průhledná folie na zalepení destiček (VWR International, Radnor, Spojené státy americké)

6.1.3 Přístroje

- analytické váhy (Kern, Balingen, Německo)
- laminární box (ESCO, Singapur)
- vortex (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- centrifuga (Hettich, Tuttlingen, Německo)
- denzitometr (Erba Lachema, s.r.o., Brno, Česká republika)
- termostat (Binder, Tuttlingen, Německo)
- multidetekční reader Synergy HTX (BioTek, Winooski, Spojené státy americké)

6.2 Postup testování

6.2.1 Příprava látek

Nejdříve se dodané sloučeniny a standardy rozpustí ve vypočítaném množství DMSO (dimethylsulfoxid) podle vztahu: $\text{navážka} \times 50 = \text{množství DMSO v } \mu\text{l}$. Následně se roztok důkladně promíchá na vortexu do úplného rozpuštění. Pokud nedojde k úplnému rozpuštění látky, naředí se roztok ještě jednou stejným objemem DMSO. Výsledná koncentrace léčivé látky tak bude o polovinu nižší. Případně můžeme přidat ještě další 2 ekvivalenty DMSO, čímž dojde ke 4-násobnému ředění. Pokud se ani poté látka nerozpustí, nepokračuje se dále v jejím testování. Výjimkou je standard ciprofloxacin, který se používá ve formě homogenní suspenze.

6.2.2 Příprava roztoků v bujónu

Z připravených roztoků testovaných látek se odebere určité množství a doředí se bujónem Middlebrook 7H9 na požadovanou koncentraci. Pro standardy ciprofloxacin a rifampicin se používá větší ředění z důvodu nižší MIC (minimální inhibiční koncentrace).

Pro testování *M. smegmatis* a *M. aurum* platí ředění:

RIF (rifampicin) - 25 μl naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu

CIP (ciprofloxacin) - 20 μl naředěné suspenze + 980 μl DMSO \rightarrow 25 μl 2. naředěné suspenze + 2,475 ml bujónu

INH (isoniazid) - 50 μl naředěného roztoku + 450 μl bujónu

Testované látky - 50 μl naředěného roztoku + 450 μl bujónu

Pro testování *M. tuberculosis* H37Ra platí ředění:

RIF (rifampicin) - 20 μ l naředěného roztoku + 980 μ l DMSO \rightarrow 50 μ l 2. naředěného roztoku + 450 μ l DMSO \rightarrow 25 μ l 3. naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu

CIP (ciprofloxacin) - 20 μ l naředěné suspenze + 980 μ l DMSO \rightarrow 25 μ l 2. naředěné suspenze + 2,475 ml bujónu

INH (isoniazid) - 20 μ l naředěného roztoku + 980 μ l DMSO \rightarrow 25 μ l 2. naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu

Testované látky - 50 μ l naředěného roztoku + 450 μ l bujónu

Všechny takto připravené vzorky se následně důkladně promíchají na vortexu.

6.2.3 Příprava destičky

Destička se popíše typem testovaných látek, pozitivní a negativní kontrolou a označí se zkratkou mykobakteriálního kmene, který bude na destičku použit. Do obvodových jamek destičky se napipetuje 250 μ l sterilní H₂O, aby nedocházelo během inkubace k vysychání. Do sloupců 2-9 a 11 (pozitivní kontrola) se napipetuje 100 μ l bujónu Middlebrook 7H9. Do sloupce 10 (negativní kontrola) se napipetuje 200 μ l tohoto bujónu.

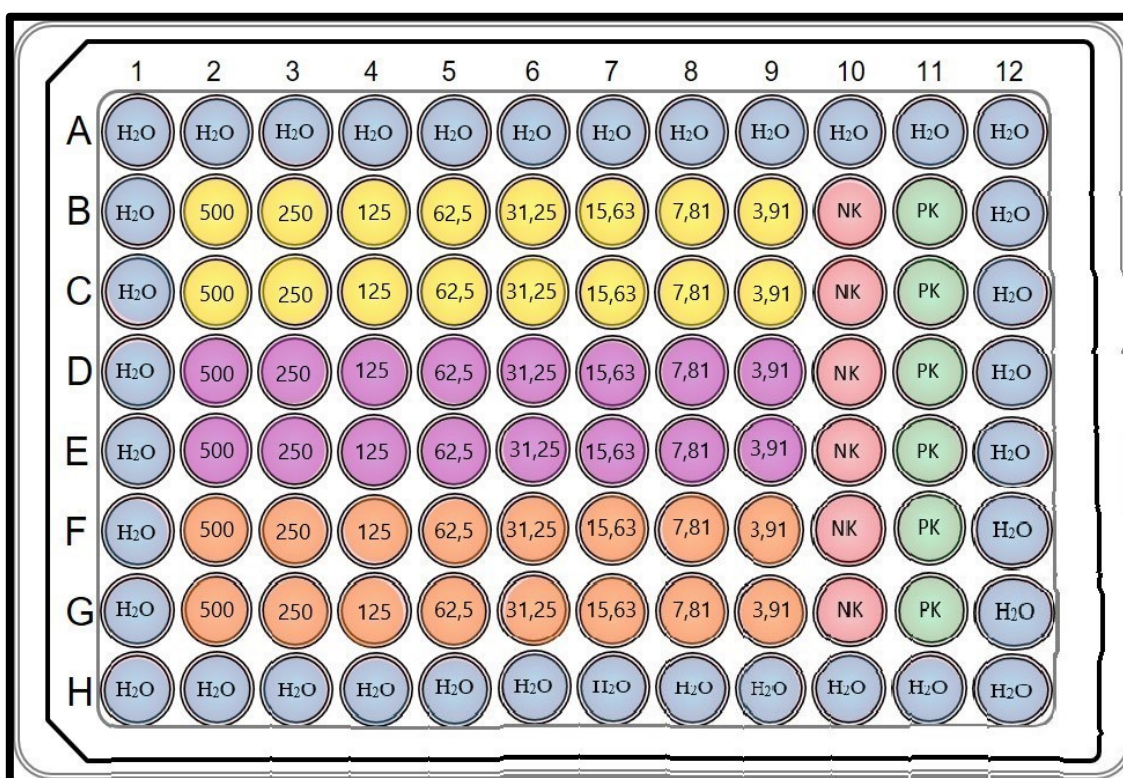
6.2.4 Pipetování látek

Do druhého sloupce se v duplikátu napipetuje 100 μ l připraveného roztoku dané testované látky v bujónu. Na jedné destičce lze tedy testovat 3 látky. Pomocí multikanálové pipety se provede dvojkové ředění. Napipetované roztoky látek se pomocí pipety promíchají s bujónem již připraveným v jamkách destičky. Odebere se 100 μ l každé promíchané látky s bujónem a napipetuje se do dalšího sloupce. Tímto způsobem se provádí ředění i v dalších sloupečcích až do sloupce 9, z tohoto sloupce se poté odebere 100 μ l a vyhodí se i s použitými špičkami do odpadu.

6.2.5 Příprava suspenze

Vytvoří se suspenze z inokula příslušného mykobakteriálního kmene v bujónu. Po inkubaci se vzniklá suspenze stočí na centrifuze, bujón se slije a zbylá suspenze se rozsuspenduje v asi 4 ml čerstvého bujónu. Následuje změření OD (optické denzity) na denzitometru – požadována je hodnota 1.0 McFarlanda (výsledná hodnota dle OD samotného média). V případě potřeby se suspenze naředí bujónem. Pracovní suspenze se vytvoří naředěním připravené suspenze čistým bujónem v poměru 1:20 pro *M. smegmatis* a *M. aurum*,

v poměru 1:10 pro *M. tuberculosis* H37Ra. Do každé jamky destičky kromě negativní kontroly (sloupec 10) a jamek obvodových (sterilní H₂O) se napipetuje 100 µl připravené mykobakteriální suspenze příslušného kmene. Dojde tak k vytvoření finálních koncentrací testovaných látek v jednotlivých jamkách (obr. 24). Pro standardy se používá jiné ředění, dojde tedy k vytvoření jiných koncentračních rozmezí. Při testování na *M. smegmatis* a *M. aurum* byla pro INH finální koncentrace v rozmezí od 500 do 3,91 µg/ml, pro CIP byla od 1 do 0,0078 µg/ml a pro RIF od 50 do 0,39 µg/ml. Při testování na *M. tuberculosis* byly pro INH a CIP finální koncentrace v rozmezí od 1 do 0,0078 µg/ml a pro RIF od 0,1 do 0,00078 µg/ml.



Obrázek 24 Schéma mikrotitrační destičky

NK - negativní kontrola (200 µl bujónu), *PK* - pozitivní kontrola (100 µl bujónu + 100 µl mykobakteriální suspenze), H₂O – voda (250 µl), *žlutě*, *fialově* a *oranžově* - testované látky v duplikátech uvedené ve finálních koncentracích (500 – 3,91) v µg/ml

zdroj: autor práce

6.2.6 Inkubace

Na závěr se destičky s *M. tuberculosis* zalepí průhlednou fólií. Poté se nechají inkubovat v termostatu při 37 °C a to 2 dny (*M. smegmatis*), 3 dny (*M. aurum*), nebo 5 dnů (*M. tuberculosis*).

Po 2 dnech se zakapou destičky s *M. smegmatis* indikátorem Alamar Blue (jedná se o 0,1% roztok sodné soli resazurinu v 5% vodném roztoku Tweenu 80) tak, že se pipetou přidá 20 µl indikátoru (10 % objemu v jamce) do každé jamky kromě obvodových. K odečítání MIC dochází po 2,5 - 3 hodinách.

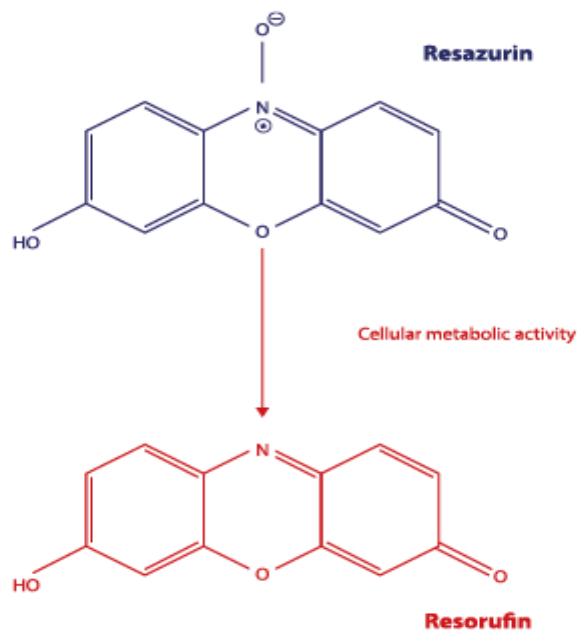
Po 3 dnech se zakapou destičky s *M. aurum* indikátorem Alamar Blue stejným způsobem. Přidá se 20 µl indikátoru do každé jamky kromě obvodových a MIC se tentokrát odečítá po 4 hodinách.

Po 5 dnech se zakapou destičky s *M. tuberculosis* indikátorem Alamar Blue opět stejným způsobem. Přidá se 20 µl do každé jamky kromě obvodových a MIC se tentokrát odečítá po 18 hodinách.

6.2.7 Vyhodnocení

Vlastní vyhodnocení probíhá po inkubaci. Jednoduchou možností je vizuální odečet, při kterém se odečítá poslední jamka bez zákalu, nebo první jamka se zákalem. Hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) je někde v tomto rozmezí. Výsledky se tedy odečítají jako nejnižší koncentrace antimikrobní látky MIC, která inhibuje viditelný růst mikroorganismu detekovaný pouhým okem. (EUCAST, 2020)

Druhou možností je použití zmíněného indikátoru Alamar Blue, což je barvivo založené na resazurinu, které funguje jako metabolický indikátor životaschopných buněk pomocí redukční síly, používaný ke kvantitativnímu měření životaschopnosti. Resazurin, aktivní složka činidla, je netoxická sloučenina propustná pro buňky, která má modrou barvu a je prakticky nefluorescenční. Po vstupu do živých buněk se resazurin redukuje na resorufin, který má růžovou barvu a vydává silnou červenou fluorescenci (obr. 25). Změny životaschopnosti buněk lze snadno detekovat pomocí čtečky destiček na bázi absorbance (detekováno při 570 a 600 nm) nebo fluorescence (pomocí excitace mezi 530-560 a emise při 590 nm). Jako hodnota MIC je považována první jamka, ve které dojde ke změně barvy z modré na růžovou. (thermofisher.com)



Obrázek 25 Změna resazurinu na resorufin v živých buňkách

Cellular metabolic activity - buněčná metabolická aktivita

zdroj: <https://lifescience.canvaxbiotech.com/product/resazurin-cell-viability-assay/>

Vyhodnocení fluorescence probíhalo pomocí multidetekčního readeru Synergy HTX (obr. 26) za použití excitačního filtru 528/20 nm a emisního filtru 585/10 nm.



Obrázek 26 Multidetekční reader Synergy HTX (BioTek, Winooski, Spojené státy americké)

zdroj: <https://www.ibiotech.cz/produkt/Synergy-HTX>

6.3 Testovací kmeny

6.3.1 *M. smegmatis*

V roce 1884 Lustgarten izoloval druh pojmenovaný jako *M. smegmatis* (obr. 27), k přesnému pojmenování tohoto druhu došlo až v roce 1889 Lehmannem a Neumannem. *M. smegmatis* se běžně vyskytuje v půdě, vodě a rostlinách. Lze ho nejvíce nalézt v Austrálii, Rusku, Kanadě a Švýcarsku. *M. smegmatis* je obvykle známo jako saprofytická skupina mykobakterií, která zřídka způsobuje infekce. Při kultivaci na dostupných půdách je tento mikrob sametově bílý a jemně vrásčitý. Když se kultivuje déle než 48 hodin, růst je hojnější a barva se změní z bílé na sametově žlutou. Povrchová morfologie *M. smegmatis* je lesklá, hladká, jemně zvrásněná nebo i hrubá. Bylo zjištěno, že *M. smegmatis* je nepatogenní a rychleji se kultivuje než jiné druhy mykobakterií. Proto se *M. smegmatis* využívá pro výzkumnou činnost a testování mykobakterií v laboratořích. (Sundarsingh, 2020)



Obrázek 27 *M. smegmatis* rostoucí na agaru Middlebrook 7H9

zdroj: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

6.3.2 *M. aurum*

M. aurum (obr. 28) se obvykle vyskytuje ve vlhkých podmínkách. Jedná se o rychle rostoucí mykobakterie vyrůstající ve zlatavých koloniích, které u lidí zřídka způsobují infekce. Stejně jako u zmíněné *M. smegmatis* obsahuje buněčná stěna mykolové kyseliny, které jsou analogické ke složkám stěny *M. tuberculosis*. Z toho důvodu mají i podobnou citlivost k antimikrobním látkám. Rovněž rychlý růst a nízká patogenita *M. aurum* vedly k jeho použití jako náhrady vysoce patogenní *M. tuberculosis* ve studiích antimikrobiální aktivity

antituberkulotik. Na rozdíl od *M. smegmatis*, má *M. aurum* schopnost přežít uvnitř makrofágů a používá se k intracelulárnímu skríníngu léčiv, což umožňuje hodnocení schopnosti léčiv pronikat buněčnou membránou a zjišťovat jejich stabilitu v buňce. (Phelan, 2015)

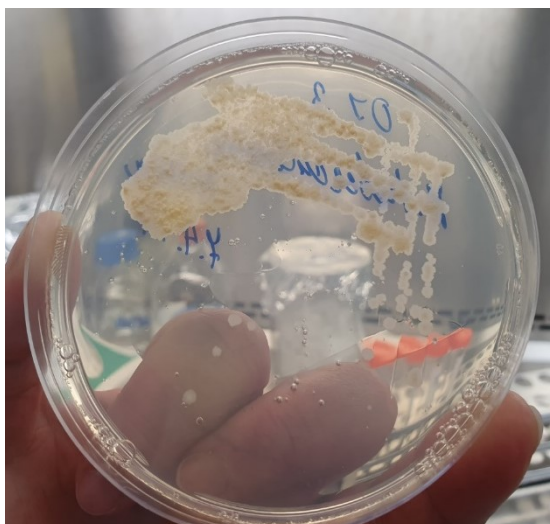


Obrázek 28 *M. aurum* rostoucí na agaru Middlebrook 7H9

zdroj: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

6.3.3 *M. tuberculosis* H37Ra

M. tuberculosis H37Ra (avirulentní kmen) (obr. 29) je oslabený tuberkulózní bacil, který je blízce příbuzný virulentnímu typu kmene *M. tuberculosis* H37Rv. Je však třeba poznamenat, že kmen H37Ra je považován spíše za kmen oslabený než za zcela avirulentní, protože byl pozorován značný růst mykobakterií u makrofágů *in vitro*. Mezi těmito dvěma kmeny existuje několik rozdílů. *M. tuberculosis* H37Rv má morfologii hladkých kolonií, zatímco kmen H37Ra spíše kolonií drsných. Oslabený kmen také vykazuje sníženou míru přežití uvnitř makrofágů za anoxických podmínek. Genomovými studiemi bylo zjištěno 272 genetických variací (inzerce, delece a varianty jednotlivých nukleotidů) mezi těmito dvěma kmeny. Další nedávné studie odhalily zhruba 172 lišících se proteinů, 89 integrálních membránových proteinů a 74 cytoplazmatických proteinů lišících se v pořadí a zastoupení jednotlivých aminokyselin. Citlivost na většinu používaných antimykobakteriálních sloučenin je mezi kmeny H37Rv a H37Ra stejná nebo velmi podobná. Proto se avirulentní kmen používá v laboratořích jako bezpečný náhradní organismus kmene virulentního. (Heinrichs, 2018)

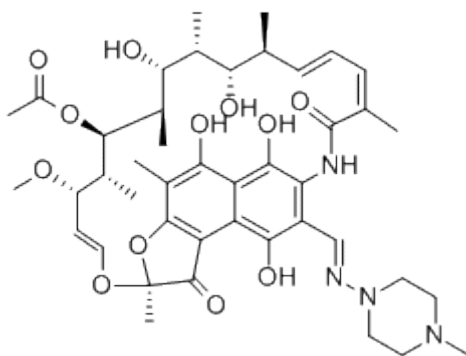


Obrázek 29 *M. tuberculosis H37Ra* rostoucí na agaru Middlebrook 7H9

zdroj: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D

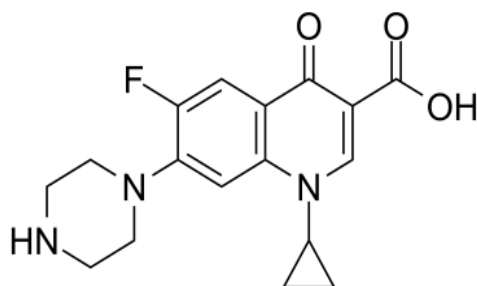
6.4 Standardy

Jako standardy byly při testování použity rifampicin (obr. 30), ciprofloxacin (obr. 31) a isoniazid (obr. 32) dodané firmou Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Struktury těchto látek vidíme na následujících obrázcích.



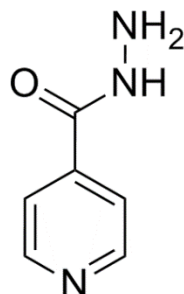
Obrázek 30 *Struktura rifampicinu (RIF)*

zdroj: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7474473.htm



Obrázek 31 **Struktura ciprofloxacinu (CIP)**

zdroj: <https://www.medchemexpress.com/Ciprofloxacin.html>



Obrázek 32 **Struktura isoniazidu (INH)**

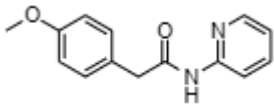
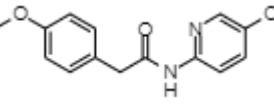
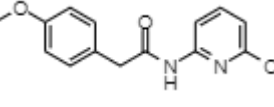
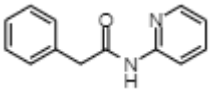
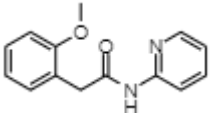
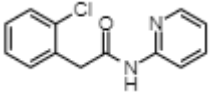
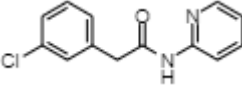
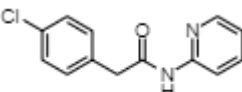
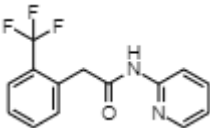
zdroj: https://www.chemsrc.com/en/cas/54-85-3_832365.html

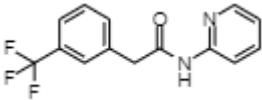
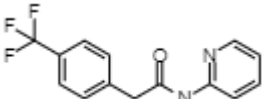
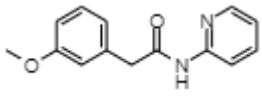
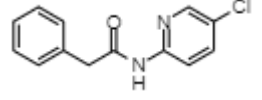
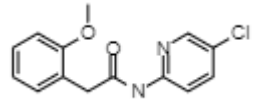
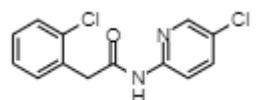
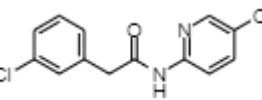
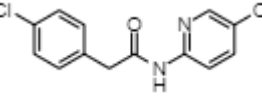
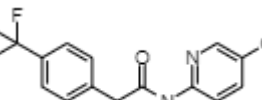
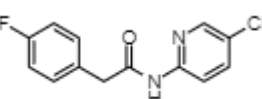
6.5 Testované látky

Celkem bylo testováno 81 potenciálních antituberkulotik ve 3 sériích. Každá série byla doplněna o testování standardů. Látky z první (tab. 3) a druhé (tab. 4) série, tedy 62 látek, byly laskavě poskytnuty od MSc. Darii Nawrot. Látky ze třetí série (tab. 5), tedy 19 látek, poskytl PharmDr. Martin Juhás. Struktury testovaných látek byly vytvořeny pomocí programu ChemDraw (PerkinElmer, Waltham, Spojené státy americké).

V následujících tabulkách je vždy uvedeno pracovní označení látky, její strukturní vzorec, ClogP, MW (*molecular weight* - molekulová hmotnost) a celý název testované látky. ClogP je rozdělovací koeficient teoreticky vypočítaný v programu ChemDraw. Jedná se o parametr lipofility, který představuje velmi důležitou fyzikálně-chemickou vlastnost potenciálního léčiva. Čím je ClogP nižší, tím je látka hydrofilnější, naopak čím je ClogP vyšší, tím je lipofilnější.

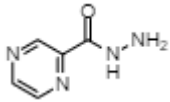
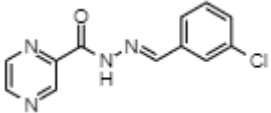
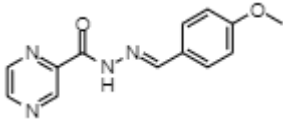
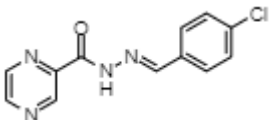
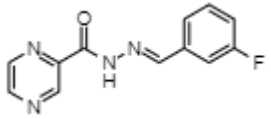
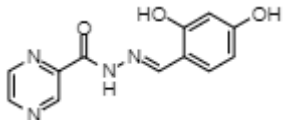
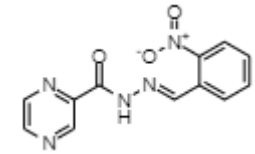
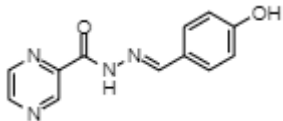
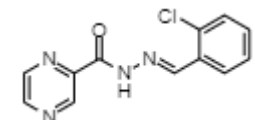
Tabulka 3 Testované látky v 1. sérii

Označení látky	Struktura	Celý název látky	ClogP	MW
2		2-(4-methoxyfenyl)- <i>N</i> -(pyridin-2-yl)acetamid	1,95	242,27
5		2-(4-methoxyfenyl)- <i>N</i> -(5-chloropyridin-2-yl)acetamid	2,78	276,72
6		2-(4-methoxyfenyl)- <i>N</i> -(6-chloropyridin-2-yl)acetamid	2,78	276,72
20		2-fenyl- <i>N</i> -(pyridin-2-yl)acetamid	2,03	212,25
21		2-(2-methoxyfenyl)- <i>N</i> -(pyridin-2-yl)acetamid	1,95	242,27
22		2-(2-chlorofenyl)- <i>N</i> -(pyridin-2-yl)acetamid	2,74	246,69
23		2-(3-chlorofenyl)- <i>N</i> -(pyridin-2-yl)acetamid	2,74	246,69
24		2-(4-chlorofenyl)- <i>N</i> -(pyridin-2-yl)acetamid	2,74	246,69
25		<i>N</i> -(pyridin-2-yl)-2-(2-(trifluormethyl)fenyl)acetamid	2,91	280,25

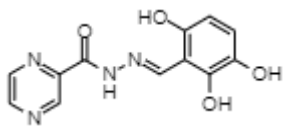
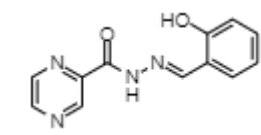
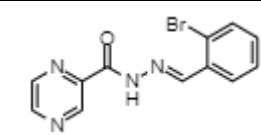
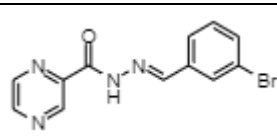
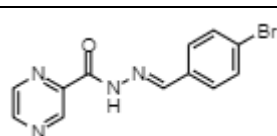
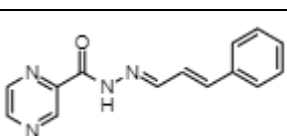
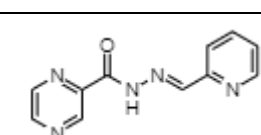
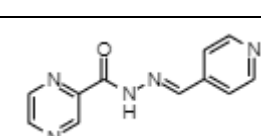
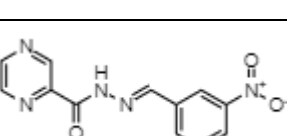
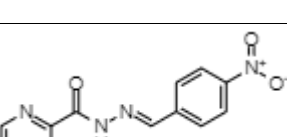
26		<i>N</i> -(pyridin-2-yl)-2-(3-(trifluormethyl)phenyl)acetamid	2,91	280,25
27		<i>N</i> -(pyridin-2-yl)-2-(4-(trifluormethyl)phenyl)acetamid	2,91	280,25
29		2-(3-methoxyphenyl)- <i>N</i> -(pyridin-2-yl)acetamid	1,95	242,27
50		2-phenyl- <i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid	2,86	246,69
51		2-(2-methoxyphenyl)- <i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid	2,78	276,72
52		2-(2-chlorfenyl)- <i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid	3,57	281,14
53		2-(3-chlorfenyl)- <i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid	3,57	281,14
54		2-(4-chlorfenyl)- <i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid	3,57	281,14
57		<i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl)-2-(4-(trifluormethyl)phenyl)acetamid	3,74	314,69
58		2-(4-fluorfenyl)- <i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl)acetamid	3,00	264,68

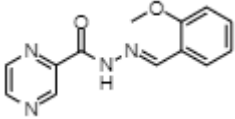
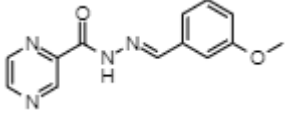
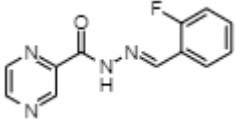
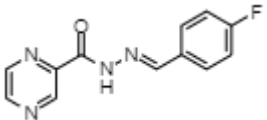
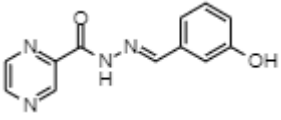
59		2-(3-methoxyphenyl)- <i>N</i> -(5-chloropyridin-2-yl)acetamid	2,78	276,72
60		2-phenyl- <i>N</i> -(6-chloropyridin-2-yl)acetamid	2,86	246,69
61		2-(2-methoxyphenyl)- <i>N</i> -(6-chloropyridin-2-yl)acetamid	2,78	276,72
62		2-(2-chlorphenyl)- <i>N</i> -(6-chloropyridin-2-yl)acetamid	3,57	281,14
64		2-(4-chlorphenyl)- <i>N</i> -(6-chloropyridin-2-yl)acetamid	3,57	281,14
66		<i>N</i> -(6-chloropyridin-2-yl)-2-(3-(trifluormethyl)phenyl)acetamid	3,74	314,69
67		<i>N</i> -(6-chloropyridin-2-yl)-2-(4-(trifluormethyl)phenyl)acetamid	3,74	314,69
68		2-(4-fluorphenyl)- <i>N</i> -(6-chloropyridin-2-yl)acetamid	3,00	264,68
69		2-(3-methoxyphenyl)- <i>N</i> -(6-chloropyridin-2-yl)acetamid	2,78	276,72

Tabulka 4 Testované látky v 2. sérii

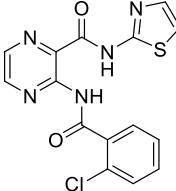
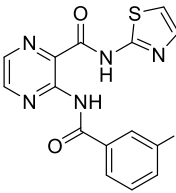
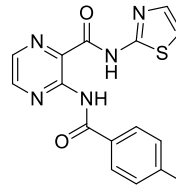
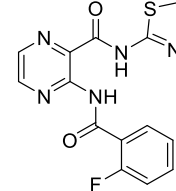
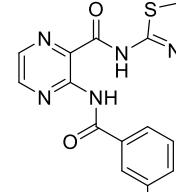
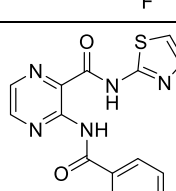
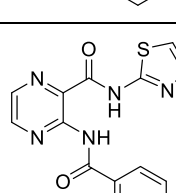
Označení látky	Struktura	Celý název látky	ClogP	MW
DP0		pyrazin-2-karbohydrazid	-1,16	138,13
DP1		(E)-N'-(3-chlorobenzyliden)pyrazin-2-karbohydrazid	-1,72	260,68
DP2		(E)-N'-(4-methoxybenzyliden)pyrazin-2-karbohydrazid	1,16	256,26
DP3		(E)-N'-(4-chlorobenzyliden)pyrazin-2-karbohydrazid	1,72	260,68
DP4		(E)-N'-(3-fluorobenzyliden)pyrazin-2-karbohydrazid	1,15	244,22
DP5		(E)-N'-(2,4-dihydroxybenzyliden)pyrazin-2-karbohydrazid	1,04	258,23
DP6		(E)-N'-(2-nitrobenzyliden)pyrazin-2-karbohydrazid	0,38	271,23
DP7		(E)-N'-(4-hydroxybenzyliden)pyrazin-2-karbohydrazid	0,91	242,23
DP8		(E)-N'-(2-chlorobenzyliden)pyrazin-2-karbohydrazid	1,12	260,68

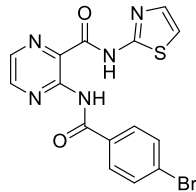
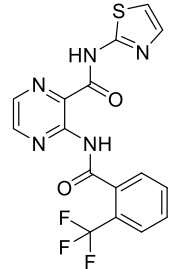
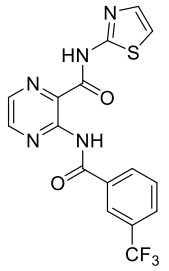
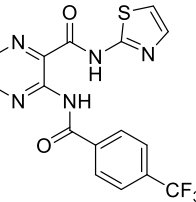
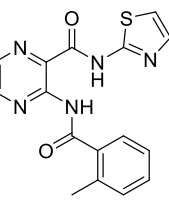
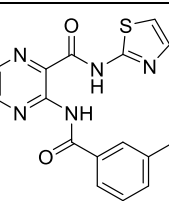
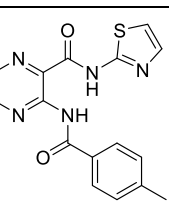
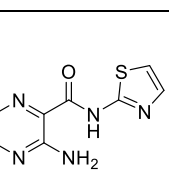
DP9		(E)- <i>N'</i> -(furan-2-ylmetylen)pyrazin-2-karbohidrazid	0,18	216,20
DP10		(E)- <i>N'</i> -(cyklopropylmetylen)pyrazin-2-karbohidrazid	0,40	190,20
DP11		(E)- <i>N'</i> -(thiazol-2-ylmetylen)pyrazin-2-karbohidrazid	-0,47	233,25
DP12		(E)- <i>N'</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden)pyrazin-2-karbohidrazid	0,71	272,26
DP13		(E)- <i>N'</i> -((3-methylthiofen-2-yl)metylen)pyrazin-2-karbohidrazid	0,86	246,29
DP14		(E)- <i>N'</i> -(4-formylbenzyliden)pyrazin-2-karbohidrazid	0,56	254,24
DP15		(E)- <i>N'</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyliden)pyrazin-2-karbohidrazid	0,88	287,23
DP17		(E)- <i>N'</i> -(thiofen-2-yl)metylen)pyrazin-2-karbohidrazid	0,66	232,26
DP18		<i>N'</i> -(difenylmetylen)pyrazin-2-karbohidrazid	3,41	302,33
DP19		(E)- <i>N'</i> -(2,3-dihydroxybenzyliden)pyrazin-2-karbohidrazid	1,04	258,23

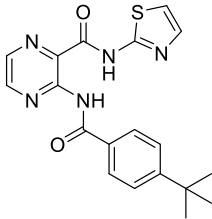
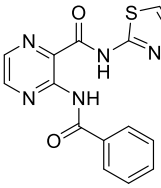
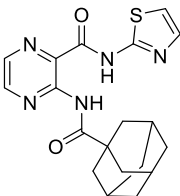
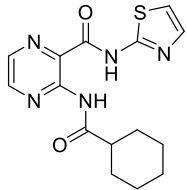
DP20		(E)-N'-(2,3,6-trihydroxybenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	1,06	274,23
DP24		(E)-N'-(2-hydroxybenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	1,54	242,23
DP26		(E)-N'-(2-bromobenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	1,22	305,13
DP27		(E)-N'-(3-bromobenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	1,87	305,13
DP28		(E)-N'-(4-bromobenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	1,87	305,13
DP29		N'-((1E,2E)-3-phenylallylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	1,49	252,27
DP30		(E)-N'-(pyridin-2-ylmetylen)pyrazin-2-karbohydrazid	-0,27	227,22
DP32		(E)-N'-(pyridin-4-ylmetylen)pyrazin-2-karbohydrazid	-0,47	227,22
DP35		(E)-N'-(3-nitrobenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	0,75	271,23
DP36		(E)-N'-(4-nitrobenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	0,75	271,23

DP37		(E)-N'-(2-methoxybenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	0,73	256,26
DP38		(E)-N'-(3-methoxybenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	1,16	256,26
DP39		(E)-N'-(2-fluorbenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	0,79	244,22
DP40		(E)-N'-(4-fluorbenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	1,15	244,22
DP41		(E)-N'-(3-hydroxybenzylidene)pyrazin-2-karbohydrazid	0,91	242,23

Tabulka 5 Testované látky v 3. sérii

Označení látky	Struktura	Celý název látky	ClogP	MW
APC-AT-2Cl		3-(2-chlorobenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,00	359,79
APC-AT-3Cl		3-(3-chlorobenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,83	359,79
APC-AT-4Cl		3-(4-chlorobenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,83	359,79
APC-AT-2F		3-(2-fluorobenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	0,85	343,34
APC-AT-3F		3-(3-fluorobenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,23	343,34
APC-AT-4F		3-(4-fluorobenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,26	343,34
APC-AT-3Br		3-(3-bromobenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,98	404,24

APC-AT-4Br		3-(4-bromobenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,98	404,24
APC-AT-2CF3		<i>N</i> -(thiazol-2-yl)-3-(2-(trifluormethyl)benzamido)pyrazin-2-karboxamid	0,80	393,34
APC-AT-3CF3		<i>N</i> -(thiazol-2-yl)-3-(3-(trifluormethyl)benzamido)pyrazin-2-karboxamid	2,01	393,34
APC-AT-4CF3		<i>N</i> -(thiazol-2-yl)-3-(4-(trifluormethyl)benzamido)pyrazin-2-karboxamid	2,01	393,34
APC-AT-2Me		3-(2-methylbenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,27	339,37
APC-AT-3Me		3-(3-methylbenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,61	339,37
APC-AT-4Me		3-(4-methylbenzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,61	339,37
APC-AT		3-amino- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	0,32	221,24

APC-AT-tBu		3-(4-(terc-butyl)benzamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	2,93	381,45
APC-AT-B		3-benzamido- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,11	325,35
APC-AT-Adam		3-(adamantan-1-karboxamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	2,28	383,47
APC-AT-cHex		3-(cyklohexankarboxamido)- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid	1,65	331,39

7 VÝSLEDKY

V následujících tabulkách jsou vždy uvedeny MIC pro konkrétní látku a daný testovací mykobakteriální kmen. Hodnoty jsou v jednotkách $\mu\text{g/ml}$. Když se před číselnou hodnotou nachází znak \geq , znamená to, že je hodnota MIC větší než naše nejvyšší dosažená koncentrace látky a že je látka v testovaném koncentračním rozmezí neúčinná. U některých látek je v tabulce poznámka o ředění z důvodu nižší rozpustnosti.

Tabulka 6 Výsledky testování první skupiny látek 1. série

Označení	2	5	6	20	21	22	23
MIC <i>M. smeg.</i> ($\mu\text{g/ml}$)	62.5	≥ 500	31.25	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> ($\mu\text{g/ml}$)	250	≥ 500	62.5	≥ 500	250	250	250
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra ($\mu\text{g/ml}$)	125	≥ 500	31.25	250	125	62.5	62.5
pozn.							
Označení	24	25	26	27	29	50	51
MIC <i>M. smeg.</i> ($\mu\text{g/ml}$)	31.25	250	≥ 500	≥ 500	≥ 500	62.5	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> ($\mu\text{g/ml}$)	≥ 500	250	125	≥ 500	250	250	≥ 500
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra ($\mu\text{g/ml}$)	62.5	125	62.5	31.25	62.5	62.5	≥ 500
pozn.							

V první skupině látek první testované série (tab. 6) vykazalo účinnost na *M. smegmatis* 5 testovaných látek s označením 2, 6, 24, 25 a 50. Nejvyšší účinnost měly látky 6 a 24 (shodně MIC = 31,25 $\mu\text{g/ml}$). Na *M. aurum* vykazalo účinnost 9 látek, z nichž se jako nejúčinnější jevila látka s označením 6 (MIC = 62,5 $\mu\text{g/ml}$). Na *M. tuberculosis* H37Ra působilo 12 látek, největší účinnost měly látky 6 a 27 (shodně MIC = 31,25 $\mu\text{g/ml}$). Dobré účinnosti měly látky 22, 23, 24, 26, 29 a 50. V této skupině látek tedy měla nejvyšší účinnost látka 6, která byla dobře účinná na všechny 3 testovací kmeny. Dobré účinnosti (avšak ne vždy na všechny kmeny) měly látky s označením 2, 24, 26, 50. Látky 5 a 51 se v testovaném koncentračním rozmezí jevily jako neúčinné.

Tabulka 7 Výsledky testování druhé skupiny látek 1. série

Označení	52	53	54	57	58	59	60
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	62.5
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	250	≥ 500	≥ 500	125	500	62.5
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	≥ 500	125	≥ 500	125	≥ 500	31.25	62.5
pozn.							
Označení	61	62	64	66	67	68	69
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	31.25
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	250	≥ 500	15.625	≥ 500	≥ 500	62.5
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	≥ 500	31.25	500	31.25	7.81	≥ 500	31.25
pozn.							

Ve druhé skupině látek první testované série (tab. 7) vykázaly dobrou účinnost na *M. smegmatis* 2 látky s označením 60 a 69. Vyšší účinnost měla látka 69 (MIC = 31,25 µg/ml). Na *M. aurum* mělo účinnost 7 látek, přičemž látka 59 prakticky minimální. Nejvyšší účinnost jevila látka 66 (MIC = 15,625 µg/ml). Látky 60 a 69 u tohoto kmene měly dobrou účinnost. Na *M. tuberculosis* H37Ra působilo celkem 9 látek. Látky 59, 62, 66, 69 a především 67 (MIC = 7,81 µg/ml) měly velmi dobrou účinnost. V této sérii testování měla nejvyšší účinnost již zmíněná látka 69, která dobře působila na všechny 3 testované kmeny. Dobrou účinnost na všechny 3 kmeny měla i látka 60. Naopak u látek 52, 54, 61 a 68 nebyla zaznamenána účinnost ani na jeden kmen.

Tabulka 8 Výsledky testování první skupiny látek 2. série

Označení	DP0	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 250	≥ 250	≥ 250	≥ 125	≥ 500	≥ 125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 250	≥ 250	≥ 250	≥ 125	≥ 500	≥ 125
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	≥ 500	≥ 250	≥ 250	≥ 250	≥ 125	≥ 500	≥ 125
pozn.		nařed. 2x	nařed. 2x	nařed. 2x	nařed. 4x		nařed. 4x
Označení	DP7	DP8	DP9	DP10	DP11	DP12	DP13
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 500	125	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 500	250	≥ 500	≥ 500
pozn.			nařed. 2x				

V první skupině látek druhé testované série (tab. 8) neměla účinnost na *M. smegmatis* žádná látka. Na *M. aurum* a na *M. tuberculosis* H37Ra měla účinnost pouze látka DP11, avšak na základě hodnot MIC (125 µg/ml, 250 µg/ml) nelze hovořit o významné aktivitě. Ostatní

testované látky byly v testovaném koncentračním rozmezí neúčinné. Obecně lze tedy konstatovat, že u těchto látek byla hodně špatná účinnost. Celkem 6 látek bylo potřeba více naředit z důvodu špatné rozpustnosti. Látky DP1, DP2, DP3 a DP9 byly naředěny 2x, látky DP4 a DP6 dokonce 4x.

Tabulka 9 Výsledky testování druhé skupiny látek 2. série

Označení	DP14	DP15	DP17	DP18	DP19	DP20	DP24
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	≥ 125	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 500	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 125	≥ 500	≥ 500	≥ 250	15.625	≥ 500	31.25
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	≥ 125	≥ 500	≥ 500	≥ 250	15.625	≥ 500	62.5
pozn.	nařed. 4x;susp			nařed. 2x			
Označení	DP26	DP27	DP28	DP29	DP30	DP32	DP35
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 125	≥ 250	≥ 500	≥ 250	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 125	≥ 250	125	≥ 250	≥ 500
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 125	≥ 250	250	≥ 250	≥ 500
pozn.			nařed. 4x	nařed. 2x		nařed. 2x	
Označení	DP36	DP37	DP38	DP39	DP40	DP41	
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	≥ 125	≥ 500	≥ 125	≥ 500	≥ 500	≥ 500	
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 125	≥ 500	≥ 125	≥ 500	≥ 500	≥ 500	
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	≥ 125	≥ 500	≥ 125	≥ 500	≥ 500	≥ 500	
pozn.	nařed. 4x		nařed. 4x				

Ve druhé skupině látek druhé testované série (tab. 9) neměla účinnost na *M. smegmatis* opět žádná látka. Na *M. aurum* a na *M. tuberculosis* H37Ra měla velmi dobrou účinnost látka DP19 (shodně MIC = 15,625 µg/ml), dobrou účinnost pak látka DP24. Účinnost na tyto 2 kmeny prokázala ještě látka DP30. Ostatní testované látky byly v testovaném koncentračním rozmezí neúčinné. Celkem 7 látek bylo potřeba opět více naředit z důvodů špatné rozpustnosti. Látky DP18, DP29, DP32 byly naředěny 2x a látky DP14, DP28, DP36, DP38 dokonce 4x. Látka DP14 byla i po 4-násobném naředění ve formě suspenze.

Tabulka 10 Výsledky testování látek 3. série

Označení APC-AT-	2Cl	3Cl	4Cl	2F	3F	4F	3Br
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 250	250	≥ 500	250	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	125	250	≥ 500	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	125	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
pozn.			nařed. 2x				
Označení APC-AT-	4Br	2CF3	3CF3	4CF3	2Me	3Me	3Me
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	125	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	250	62.5
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 250	≥ 500	250	≥ 500	≥ 500	7.81	3.91
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	≥ 250	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	31.25
pozn.	nařed. 2x						
Označení APC-AT-	4Me	AT	AT	tBu	B	Adam	cHex
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	≥ 500	125	125	≥ 250	≥ 125	62.5	≥ 250
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	31.25	15.625	≥ 250	≥ 125	3.91	≥ 250
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	≥ 500	125	31.25	≥ 250	≥ 125	15.625	125
pozn.				nařed. 2x	nařed. 4x		nařed. 2x

Pozn. Zde se jedná o látky APC-AT-... (v seznamu látek uvedené jako např. APC-AT-2Cl, zde v tabulce pro zkrácení jen 2Cl)

Ve třetí sérii testování (tab. 10) vykazovalo na *M. smegmatis* určitou účinnost 6 látek s označením APC-AT-2F, -4F, -4Br, -3Me, -Adam a APC-AT. Nejvyšší účinnost měly látky APC-AT-3Me a APC-AT-Adam (MIC = 62,5 µg/ml). Na *M. aurum* měly účinnost látky APC-AT-4Cl, -2F, -3CF3 a výbornou účinnost látky APC-AT (MIC = 31,25 µg/ml; 15,625 µg/ml), APC-AT-3Me (MIC = 3,91 µg/ml; 7,81µg/ml) a APC-AT-Adam (MIC = 3,91 µg/ml). Na *M. tuberculosis* H37Ra působily látky APC-AT-4Cl, -3Me, APC-AT, APC-AT-cHex a velmi dobře působila látka APC-AT-Adam (MIC = 15,625 µg/ml). Ostatní testované látky byly v testovaném koncentračním rozmezí neúčinné. V této sérii se tedy jako nejúčinnější jeví látky APC-AT-3Me, APC-AT a APC-AT-Adam, které působily na všechny testované kmeny. U látek s označením APC-AT-3Me a APC-AT bylo testování provedeno dvakrát. Látky APC-AT-4Cl, -4Br, -tBu a -cHex byly naředěny 2x, látka APC-AT-B dokonce 4x z důvodu špatné rozpustnosti.

Tabulka 11 Výsledky testování standardů ve všech sériích

1. série - standardy	INH	RIF	CIP	INH	RIF	CIP
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	15.625	3.125	0.0625	15.625	3.125	0.0625
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	3.91	0.39	0.015625	3.91	0.39	0.015625
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	0.25	0.003125	0.25	0.25	0.003125	0.25
pozn.						
2. série - standardy	INH	RIF	CIP	INH	RIF	CIP
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	15.625	3.125	0.0625	15.625	1.56	0.0625
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	3.91	0.39	0.015625	3.91	0.39	0.015625
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	0.25	0.003125	0.25	0.25	0.003125	0.25
pozn.						
	INH	RIF	CIP			
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	15.625	1.56	0.0625			
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	3.91	0.39	0.015625			
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	0.25	0.003125	0.25			
pozn.						
3. série - standardy	INH	RIF	CIP	INH	RIF	CIP
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/ml)	7.81	1.56	0.0625	15.625	3.125	0.125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	3.91	0.39	0.03125	3.91	0.39	0.015625
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	0.25	0.003125	0.25	0.25	0.003125	0.25
pozn.						

Tabulka 11 nám ukazuje výsledky testování standardů INH, RIF a CIP, které doplnilo vždy každou testovanou sérii. Hodnoty MIC standardů v jednotlivých sériích byly z velké části identické a odpovídaly známým citlivostem kmenů. V některých sériích se hodnoty jen nepatrně (1 jamka mikrotitrační destičky) odlišovaly (například u INH na *M. smegmatis* jednou byla MIC 15,625 µg/ml, podruhé 7,81 µg/ml), ale i tak lze konstatovat, že je systém testování stabilní a získané výsledky jsou validní.

8 DISKUSE

Obecně je známo, že tuberkulóza je velmi závažné infekční onemocnění, které postihuje člověka. Může však postihnout i další savce, vačnatce, ptáky, ryby, obojživelníky a plazy. Původcem TBC jsou zejména čtyři příbuzné druhy mykobakterií, *M. tuberculosis* (u člověka), *M. bovis* (u hovězího dobytka), *M. microti* (u hrabošů) a *M. africanum*. Tato diplomová práce se zaměřuje především na *M. tuberculosis* jako původce TBC u lidí. (Greenwood, 1999)

M. tuberculosis je řazeno do rodu *Mycobacterium*. Existuje zhruba 50 druhů mykobakterií, které se dělí do dvou hlavních skupin, rychle a pomalu rostoucích. Mykobakterie jsou dlouhé, štíhlé, nepohyblivé a nesporulující tyčinky. Neobvyklé složení jejich buněčné stěny jim dává charakteristické vlastnosti a vytváří voskovitý buněčný povrch, díky kterému jsou mykobakterie silně hydrofobní, to má vliv na jejich barvitelnost. Vzhledem k jedinečnému složení buněčné stěny je nelze obarvit dle Grama, používá se speciální barvení dle Ziehl-Neelsena, mykobakterie jsou tedy nazývány jako acidorezistentní.

Jak již bylo řečeno, TBC u člověka je způsobena hlavně *M. tuberculosis*, někdy může být původcem i *M. bovis* (přibližně 1 % případů). Podle dat z WHO je tímto mikroorganismem nakažena asi jedna čtvrtina lidské populace. Každý rok onemocní přibližně 10 miliónů lidí, ročně umírá kolem 1,4 miliónů lidí. (Harvey, 2007; WHO, 2020)

TBC je pandemicky rozšířenou infekcí s dlouhodobě klesajícím trendem. Významně se šíří v rozvojových zemích a v zemích tzv. třetího světa. Onemocnění je běžné v Číně, Indii, Pákistánu, východní Evropě, v subsaharské a jižní Africe. Varovným trendem je nárůst infekcí způsobených rezistentními kmeny. Například v roce 2019 téměř 0,5 miliónu případů vykazovalo rezistenci na rifampicin (RR rezistenci), z tohoto množství bylo 78 % případů klasifikováno jako multirezistentní (MDR rezistence). V České republice z dlouhodobého hlediska vykazuje počet onemocnění TBC klesající trend a v mezinárodním srovnání patříme k zemím s nízkým výskytem TBC.

Otázkou je, jaký bude vývoj v následujících letech. V současnosti je celosvětově velkým problémem pandemie COVID-19 a hrozí tak, že tato pandemie zvrátí příznivý pokrok ve snižování celosvětové zátěže onemocněním TBC. Modelování naznačuje, že počet lidí s TBC by se v období 2020-2025 mohl zvýšit o více než 1 milión ročně. Ekonomický dopad pandemie zhorší přinejmenším dva z klíčových faktorů výskytu TBC, HDP (hrubý domácí produkt) na osobu a podvýživu. Dopady na živobytí z důvodu ušlého příjmu a nezaměstnanosti

by mohly zvýšit procento lidí a jejich domácností s TBC. Mnoho zemí nyní věnuje více financí právě přednostně pandemii COVID-19, některé země dokonce oznámily použití strojů pro testování COVID-19 namísto diagnostických testů na TBC a přeřazení zaměstnanců v národních programech proti TBC na povinnosti související s COVID-19. V mnoha zemích bylo ovlivněno také shromažďování a vykazování údajů o TBC. Data za rok 2020 zatím nebyla finálně zveřejněna, ale podle předběžných odhadovaných údajů WHO bylo v roce 2020 o 1,4 miliónů méně nových případů lidí s TBC než v roce 2019, což představuje pokles o 21 %. Země s nejvyšším poklesem byly Indonésie (42 %), Jihoafrická republika (41 %), Filipíny (37 %) a Indie (25 %). (WHO, 2020)

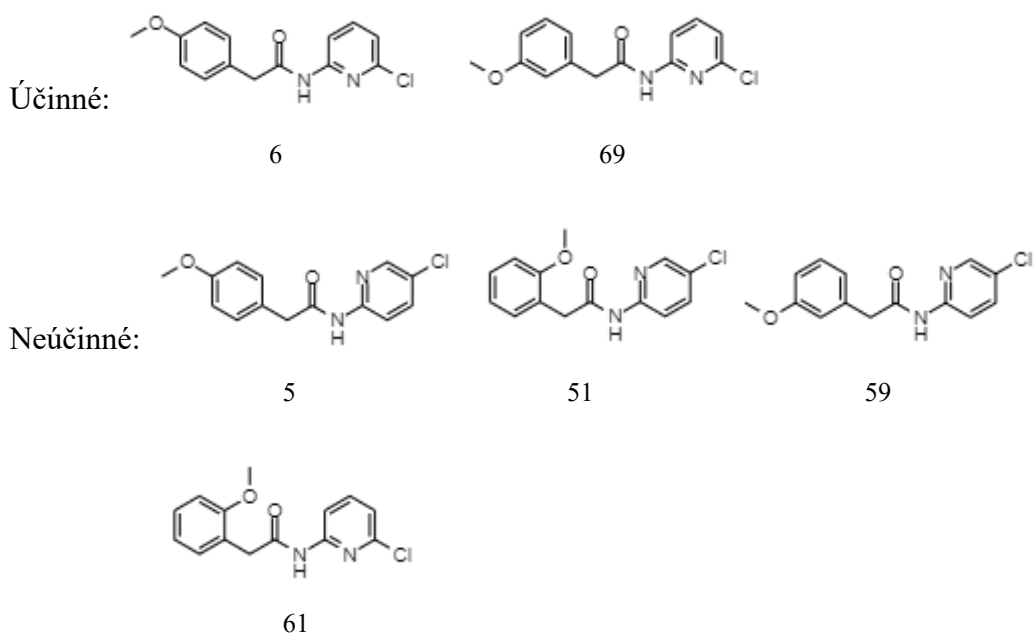
Základní terapie TBC je kombinovaná za použití obvykle čtyř antituberkulotik, isoniazidu, rifampicinu, etambutolu a pyrazinamidu. Terapie je dlouhodobá, trvající déle než 6 měsíců. I přes všechny zásady správné terapie se stále zvyšuje výskyt rezistentních kmenů na antituberkulotika první linie. Proto zdravotnické organizace monitorují výskyt rezistence, a proto je v současnosti velký zájem o výzkum a výrobu nových léčebných preparátů. Důležité je tedy objevovat a vyvíjet nové léky, které mohou zlepšit strategii léčby, zvýšit její bezpečnost, předcházet vzniku rezistentních kmenů, a řešit jak infekci, tak i možné nežádoucí účinky. (Liptáková, 2019)

Prevence onemocnění TBC je založena zejména na informovanosti, záchytu případů, testování kontaktů nemocných osob a na očkování. K očkování proti TBC se používá živá oslabená vakcína BCG. Vakcína se aplikuje novorozencům intradermálně injekcí. V 11 letech se přeočkovává, ale pouze při negativním kožním tuberkulinovém testu. Očkování se běžně provádí v zemích, kde je TBC endemická a je zodpovědná za vysokou morbiditu a mortalitu. Bohužel BCG imunizace není určena pro imunokompromitované pacienty (s HIV infekcí), proto nelze vakcinaci použít v oblastech s vysokou prevalencí HIV (Afrika). V těchto oblastech tedy zůstává TBC ještě větší hrozbou než v oblastech, ve kterých je prevalence HIV nízká a lze tedy očkovat. V České republice je plošné očkování proti TBC od 1.11.2010 ukončeno. (Votava, 2003; Petráš, 2016; Martin, 2018)

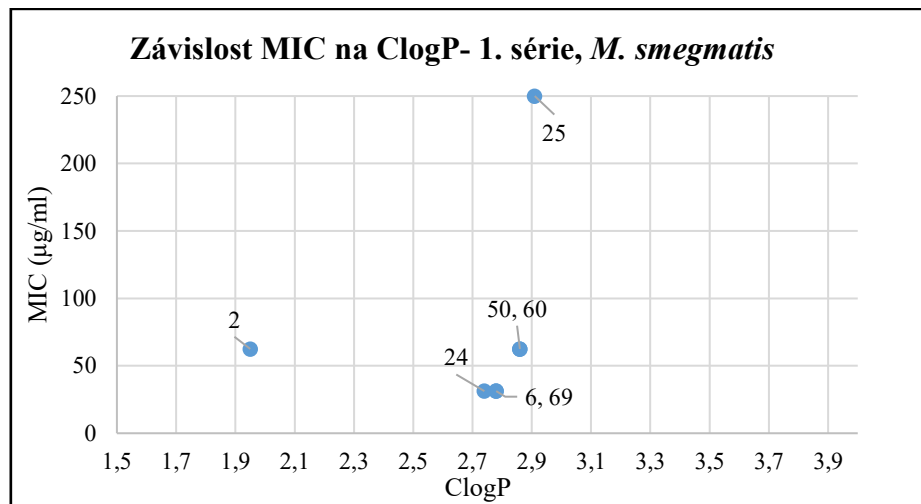
Cílem této práce bylo testování antimykobakteriální aktivity 81 potenciálních antituberkulotik ve 3 sériích na kmenech rodu *Mycobacterium* (*M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. tuberculosis*) pomocí mikrodiluční bujónové metody.

V první sérii testování (látky označené pouze číslem) bylo testováno 28 látek. Jednalo se o deriváty 2-fenyl-*N*-(pyridin-2-yl)acetamidu, které se lišily substituenty, jejich množstvím, kombinací a pozicemi. Na všechny 3 testované kmeny mělo účinnost 6 látek (2, 6, 25, 50, 60,

69). Na 2 kmeny pak vykázalo účinnost 10 látek (21, 22, 23, 24, 26, 29, 53, 59, 62, 66). Pouze na 1 kmen mělo účinnost 6 látek (20, 27, 57, 58, 64, 67). Zbylých 6 látek nepůsobilo ani na jeden testovaný kmen. Nejvyšší účinnost měly látky 6 (2-(4-methoxyfenyl)-*N*-(6-chlorpyridin-2-yl)acetamid) a 69 (2-(3-methoxyfenyl)-*N*-(6-chlorpyridin-2-yl)acetamid). Tyto látky mají ve struktuře stejné substituenty (chlor a methoxy skupinu) navázané na podobných pozicích, liší se pouze pozicí methoxy skupiny na benzylovém jádře (para- vs. meta- pozice), proto měly pravděpodobně i stejnou účinnost na testované kmeny. Stejně substituenty navázané na podobných pozicích měly ještě látky 5, 51, 59 a 61, ovšem účinnost měly prakticky minimální. Nejvýhodněji se tedy jevila substituce chlóru na pyridinu v pozici 6- a zároveň substituce methoxy skupinou v polohách 3- nebo 4- benzylového jádra. Těmito substitucemi došlo ke zvýšení lipofility (ClogP), čímž se pravděpodobně zvýšila účinnost díky faktu, že lipofilní látky snáze pronikají přes membránu mykobakterií, která je bohatá na mykolové kyseliny. Léky s vyšší lipofilitou mohou tedy lépe působit proti mykobakteriím. Poloha 6- pyridinového cyklu může ovlivňovat účinnost také díky sterickým efektům, kdy jiná poloha může bránit např. v interakci s cílovým místem těchto sloučenin. Stejně pak i substituent 2-OCH₃, jak je patrné z obrázku, může výsledek ovlivňovat díky sterickým vlivům a intramolekulárním interakcím. Slibně se na *M. tuberculosis* v této sérii jevíly ještě látky 66 a 67, tedy látky s trifluormethylovou skupinou. Trifluormethyl je velmi využívaná skupina pro substituce léčiv, která obecně zvyšuje jejich účinnost. Tato skupina v molekule však často zvyšuje i toxicitu.

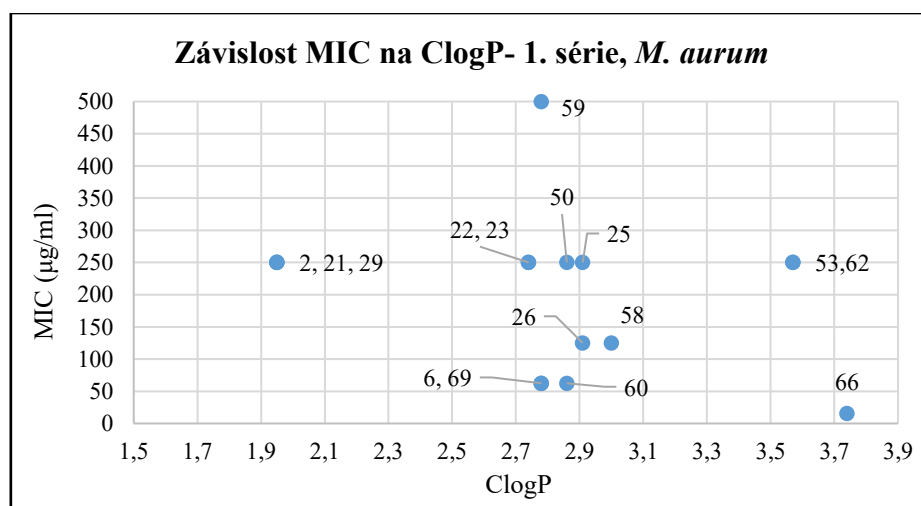


Na *M. smegmatis* zde působilo celkem 7 látek (graf 1). Největší účinnost měly látky 6, 24 a 69, u kterých byla MIC shodně 31,25 $\mu\text{g/ml}$. Při pohledu na jejich ClogP (2,74, 2,78) je patrné, že substitucemi došlo ke zvýšení lipofility. Látky 6 a 69 byly již výše probrány. Látka 24 byla vytvořena substitucí chlóru v poloze 4- benzylového jádra.



Graf 1 Závislost MIC na ClogP u látek 1. série působících na *M. smegmatis*

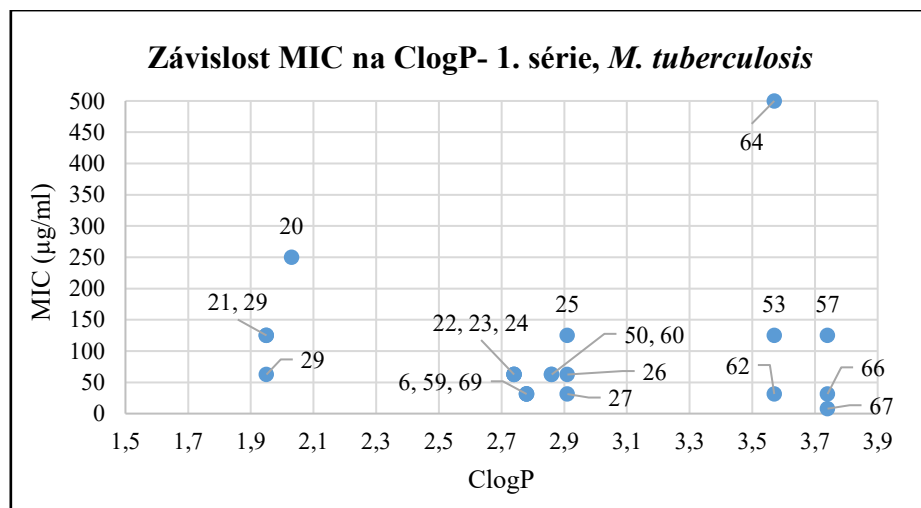
Na *M. aurum* působilo 16 látek (graf 2). Nejvyšší účinnost měla látka 66, kde MIC byla 15,625 $\mu\text{g/ml}$. Jednalo se derivát substituovaný trifluormethylovou skupinou v poloze 3- benzylového jádra a zároveň chlórem na pyridinu v pozici 6-. Těmito substitucemi došlo opět ke zvýšení lipofility látky (ClogP 3,74). Látky 6 a 69 zde měly trochu menší účinnost (MIC = 62,5 $\mu\text{g/ml}$) než u *M. smegmatis*.



Graf 2 Závislost MIC na ClogP u látek 1. série působících na *M. aurum*

Na *M. tuberculosis* působilo 21 látek (graf 3). Nejvyšší účinnost měla tentokrát látka 67 (MIC = 7,81 $\mu\text{g/ml}$), což byla nejnižší dosažená MIC v první sérii látek. Stejně jako u látky 66,

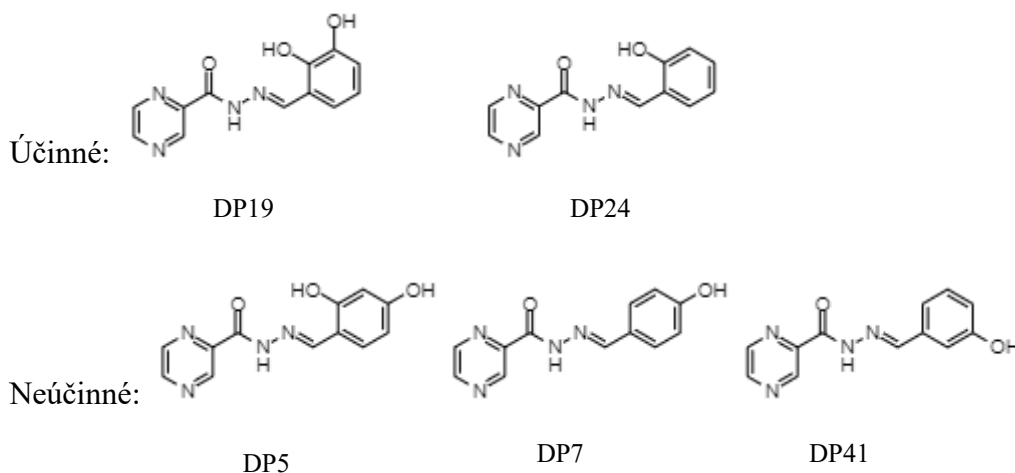
kteřá působila nejvíce na *M. aurum*, se i zde jednalo o derivát substituovaný trifluormethylovou skupinou, tentokrát v poloze 4- benzylového jádra, a zároveň chlórem na pyridinu v pozici 6-. Lipofilita látky 67 je stejná jako látky 66. Látky 6 a 69 (MIC = 31,25 µg/ml) měly u *M. tuberculosis* stejnou účinnost jako u *M. smegmatis*. Tuto hodnotu MIC měly rovněž ještě látky 27, 59, 62 a 66.



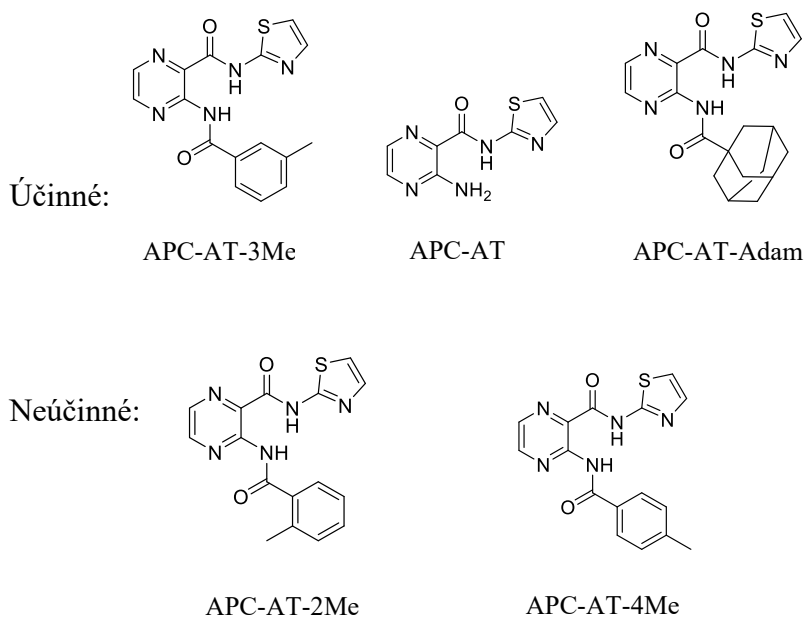
Graf 3 Závislost MIC na ClogP u látek 1. série působících na *M. tuberculosis*

V druhé sérii testování (látky s označením DP) bylo testováno 34 látek. Zde se jednalo, kromě látky DP0 (strukturní analog isoniazidu), o deriváty (E)-N'-(benzyliden)pyrazin-2-karbohydrazidu a (E)-N'-(metylen)pyrazin-2-karbohydrazidu, které se lišily substituenty, jejich množstvím, kombinací a pozicemi. Na všechny 3 testované kmeny neměla účinnost ani jedna látka. Na 2 kmeny vykazaly účinnost 4 látky (DP11, DP19, DP24, DP30). Zbýlých 30 látek nepůsobilo ani na jeden testovaný kmen. Látky z této série měly tedy v porovnání se zbylými sériemi nejhorší účinnost a pro následné další zkoušení by měly být ještě dále modifikovány. Účinně se pouze u kmenů *M. aurum* a *M. tuberculosis* H37Ra jevíly látky DP19 a DP24, které však na *M. smegmatis* vůbec v testovaném koncentračním rozmezí nepůsobily. Navíc byly látky z této série špatně rozpustné a muselo tak často dojít k většímu ředění. V porovnání ClogP těchto dvou látek s účinnými látkami ze zbylých dvou sérií je patrné, že tyto dvě látky neměly až takovou lipofilitu, což je způsobeno substitucí -OH skupinou, která často lipofilitu snižuje. DP19 mělo ClogP 1,04 a DP24 1,54. Hydroxylová skupina je velice známým donorem elektronů. U látky DP19 je zřejmé, že je výhodnější současná substituce hydroxylových skupin v polohách 2- a 3- na benzenu než v polohách 2- a 4-, jak je zavedeno například u látky DP5, kde nebyl účinek žádný. U této výhodnější substituce může být účinnost způsobena snadnější tvorbou vodíkových vazeb s receptorem (enzymem) v buňce. U látky

DP24 je zřejmé, že substituce jedné hydroxylové skupiny je výhodnější v poloze 2- (ortho-) na benzenu než v poloze 3- (DP41) a poloze 4- (DP7). U látek DP41 a DP7 totiž nebyla žádná účinnost. Vliv zde může mít opět snadnější tvorba vodíkových vazeb s receptorem (enzymem) v buňce.

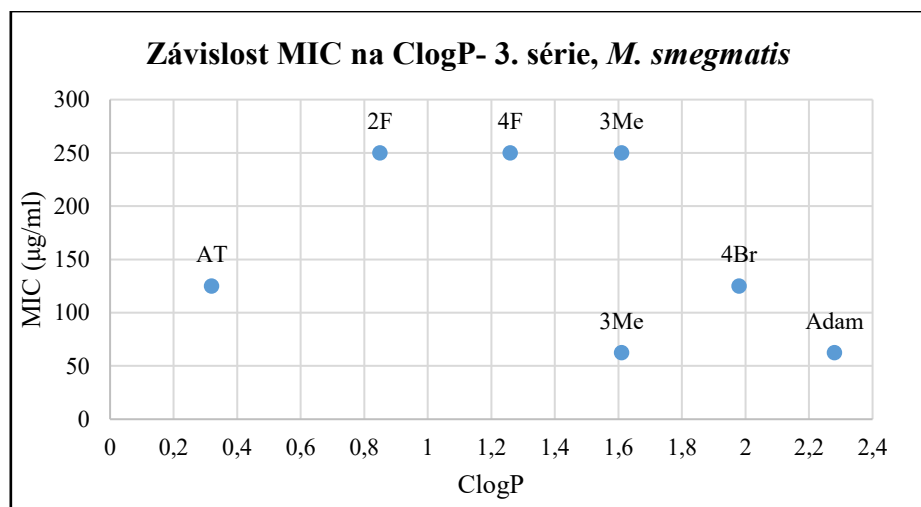


Ve třetí sérii testování (látky s označením APC-AT) bylo testováno 19 látek. Zde se jednalo o deriváty látky APC-AT (3-amino-*N*-(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid), které se lišily substituenty, jejich množstvím, kombinací a pozicemi. Na všechny 3 testované kmeny měly účinnost 3 látky (APC-AT-3Me, APC-AT, APC-AT-Adam). Na 2 kmeny vykazaly účinnost 2 látky (APC-AT-4Cl, -2F). Pouze na 1 kmen měly účinnost 4 látky (APC-AT-4F, -4Br, -3CF₃, -cHex). Zbýlých 10 látek nepůsobilo ani na jeden testovaný kmen. Látky s označením APC-AT-3Me (3-(3-methylbenzamido)-*N*-(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid) a APC-AT (3-amino-*N*-(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid) se testovaly dvakrát s téměř stejnými výsledky. Byly testovány i další látky se substitucí methylu v polohách 2- nebo 4- na fenylovém jádru, ale ty byly bez účinku na testované kmeny. Substituce methylu v poloze 3- se z methylovaných sloučenin jevila nejúčinnější. Látka APC-AT-Adam (3-(adamantan-1-karboxamido)-*N*-(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid) se v této práci jevila jako vůbec nejúčinnější. Substituce adamantanem zvýšila lipofilitu látky, a tudíž i její účinnost. Myslím si, že by těmito 3 látkám, stejně jako látkám 6 a 69 z první série, určitě měla být ve výzkumu věnována pozornost jako potencionálním antituberkulotikům. Mělo by být provedeno další laboratorní testování s více kmeny, nebo klinickými izoláty. Měla by být rovněž zkoumána možná cytotoxicita nově vyvinutých potenciálních léčiv.



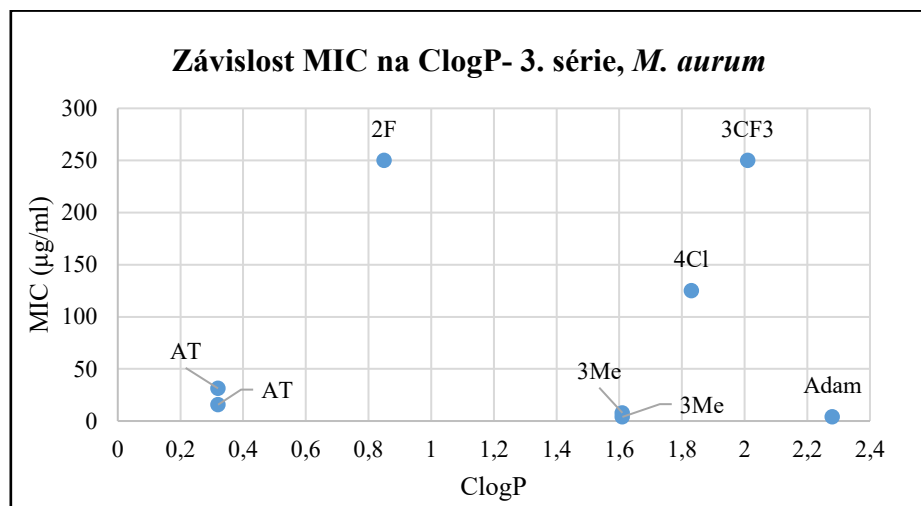
Na *M. smegmatis* ve třetí sérii působilo 6 látek (graf 4). Látky APC-AT a APC-AT-3Me byly testovány dvakrát. APC-AT měla dvakrát stejnou účinnost (MIC = 125 µg/ml). Látka APC-AT-3Me se v účinnosti lišila (MIC = 250 µg/ml, 62,5 µg/ml). Nejvyšší účinnost měly látky APC-AT-3Me a APC-AT-Adam (shodně MIC = 62,5 µg/ml). Látka APC-AT-Adam měla nejvyšší lipofilitu v této třetí sérii (ClogP 2,28), lipofilita zde může souviset se substitucí adamantanem.

Kromě toho je substituce adamantanem zřejmě výhodná také kvůli tomu, že zajišťuje zvýšenou stabilitu a distribuci léčiva v krevní plazmě. Adamantan může být také snadněji zabudován do lipofilní lipidové dvojvrstvy, která tvoří membrány, což je velmi důležitý krok pro přenos léčiva membránami. (Štimac, 2017)



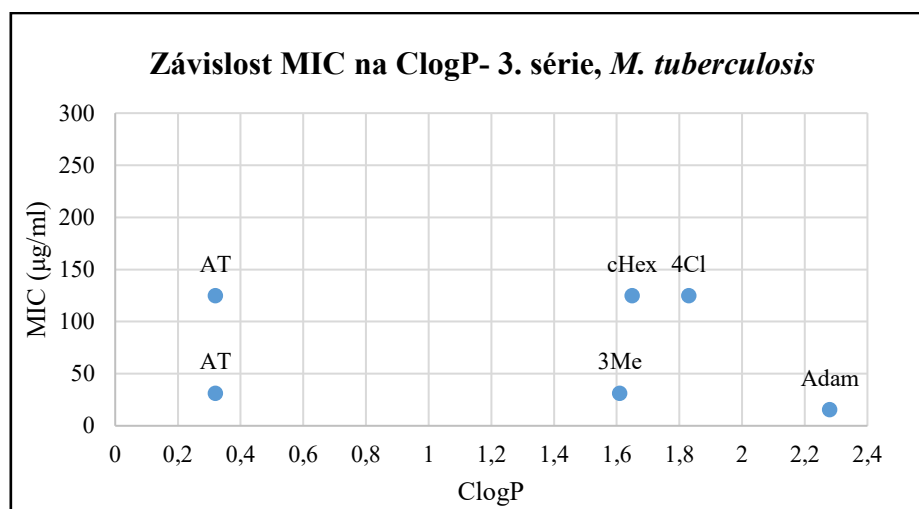
Graf 4 Závislost MIC na ClogP u látek 3. série působících na *M. smegmatis*

Na *M. aurum* působilo 6 látek (graf 5). Látky, které byly testovány dvakrát, tedy APC-AT a APC-AT-3Me, měly obě tentokrát při testování podobné účinnosti, které se lišily pouze v jedné jamce mikrotitrační destičky. Jako neúčinnější se jevily látky APC-AT-3Me a APC-AT-Adam, které měly shodně MIC = 3.91 $\mu\text{g/ml}$, což představuje nejnížší hodnotu MIC dosaženou v testování v této práci. Všechny 3 velmi dobře účinné látky (APC-AT-3Me, APC-AT, APC-AT-Adam) měly u *M. aurum* nižší hodnoty MIC než u *M. smegmatis*, byly tedy více účinné.



Graf 5 Závislost MIC na ClogP u látek 3. série působících na *M. aurum*

Na *M. tuberculosis* ve třetí sérii působilo 5 látek (graf 6). Látky APC-AT a APC-AT-3Me, které byly testovány dvakrát, se tentokrát obě při testování ve svých účinnostech lišily. Látka APC-AT-3Me jednou dokonce žádnou účinnost neměla. Nejvyšší účinnost měla látka APC-AT-Adam (MIC = 15,625 $\mu\text{g/ml}$). V porovnání s velmi dobrou účinností na *M. aurum* vykazovala tato látka na *M. tuberculosis* účinnost nižší. Rovněž látky APC-AT a APC-AT-3Me měly v porovnání s *M. aurum* účinnosti nižší.



Graf 6 Závislost MIC na ClogP u látek 3. série působících na *M. tuberculosis*

V porovnání citlivosti kmenů z testování standardů, které doplnilo vždy každou testovanou sérii, vyplývá, že na IHN je nejcitlivější *M. tuberculosis* H37Ra (MIC = 0,25 µg/ml), následuje *M. aurum* (MIC = 3,91 µg/ml), nejméně citlivý je kmen *M. smegmatis* (MIC = 15,625 µg/ml). Na RIF je rovněž nejcitlivější *M. tuberculosis* H37Ra (MIC = 0,003125 µg/ml), následuje *M. aurum* (MIC = 0,39 µg/ml), nejméně citlivý je kmen *M. smegmatis* (MIC = 3,125 µg/ml; 1,56 µg/ml). Na CIP je nejcitlivější *M. aurum* (MIC = 0,015625 µg/ml), následuje *M. smegmatis* (MIC = 0,0625 µg/ml) a až nakonec *M. tuberculosis* H37Ra (MIC = 0,25 µg/ml). Nižší hodnoty MIC v porovnání s testovanými látkami byly při testování dosaženy větším ředěním standardů a prací v jiném finálním koncentračním rozmezí.

Všechny testované látky zatím jejich autory publikovány nebyly. K publikacím by mělo dojít v následujících měsících. Výzkumná skupina prof. PharmDr. Martina Doležala, Ph.D. z katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy každoročně publikuje několik sérií látek. Pro potvrzení testování výsledků by mělo následovat opakování testování se stejnými látkami. Při testování totiž mohlo dojít hlavně k lidským chybám (nepřesné pipetování nebo ředění), přístrojové chyby by měli být eliminovány pravidelným servisem a kalibrací. Vývoj nového léku je zdlouhavý a finančně náročný proces, dobrá účinnost v prvním provedeném testování nemusí znamenat také účinnost v léčbě.

9 ZÁVĚR

Tato diplomová práce je věnována tuberkulóze, tedy velmi závažnému chronickému granulomatóznímu onemocnění. V práci je detailně popsán, charakterizován a klasifikován původce onemocnění (*M. tuberculosis*). Dále je věnována pozornost vzniku, průběhu, epidemiologii a klinickým příznakům onemocnění. Práce se rovněž zaměřuje na diagnostiku onemocnění, a to jak na část klinickou, tak na část laboratorní. Jsou popsány základní používané diagnostické metody a postupy. Nedílnou součástí problematiky je účelná terapie a prevence tohoto onemocnění, které jsou velice důležité, protože včasná léčba a prevence pomohla zachránit už několik miliónů životů na celém světě. V prevenci jsou dnes velmi důležité informovanost, rychlá a účinná léčba pacientů s aktivní TBC, pečlivé sledování kontaktů nemocných osob a testování těchto kontaktů. V zemích s vysokou morbiditou a mortalitou má obrovský význam očkování.

V experimentální části se práce zabývala testováním antimykobakteriální aktivity 81 potenciálních antituberkulotik ve 3 sériích na kmenech rodu *Mycobacterium* (*M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. tuberculosis* H37Ra) pomocí mikrodiluční bujónové metody, vyhodnocením získaných výsledků a jejich interpretací z hlediska vztahu účinnosti a struktury testovaných sloučenin.

V testování vykázalo na všechny tři testovací kmeny dobrou účinnost 5 látek s označením 6, 69, APC-AT, APC-AT-3Me, APC-AT-Adam. Těmto látkám by však k potvrzení účinnosti měla být ve výzkumu dále určitě věnována pozornost a mělo by být provedeno rozsáhlejší testování. Látky 6 a 69 pocházejí z první série testování a jednalo se o deriváty 2-fenyl-*N*-(pyridin-2-yl)acetamidu. Nejvýhodněji se v první sérii jevila substituce chlóru na pyridinu v pozici 6- a zároveň substituce methoxy skupinou v polohách 3- nebo 4-benzylového jádra.

Látky APC-AT, APC-AT-3Me, APC-AT-Adam jsou ze třetí série testování, kdy se jednalo o deriváty látky APC-AT (3-amino-*N*-(thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid). Zde se tedy nejvýhodněji jevila základní struktura a její dva deriváty, derivát se substitucí methylu v poloze 3- na fenylovém jádru a derivát se substitucí adamantanem. Nejúčinnější byla podle hodnot MIC látka s označením APC-AT-Adam. Nejméně účinná se jevila druhá série látek, tedy látky s označením DP.

Na *M. smegmatis* měly nejvyšší účinnost látky 6, 24 a 69, na *M. aurum* látky APC-AT-3Me, APC-AT-Adam, na *M. tuberculosis* látka 67.

Dále by mohlo následovat opakování testování se stejnými látkami, tím by došlo k potvrzení správnosti výsledků testování a k eliminaci chyb. Mohlo by také následovat testování s více kmeny a testování s klinickými izoláty. Vyvinutí a testování potencionálních léčiv je tedy velice dlouhý proces, zahrnující laboratorní a klinické testování. Než dojde k vyvinutí a řádnému otestování potencionálního léčiva, uplyne několik let.

10 POUŽITÉ ZKRATKY

16S rRNA	RNA (ribosomální ribonukleová kyselina) složka malé podjednotky prokaryotického ribozomu
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome, syndrom získané imunodeficience
AMTD	Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct test, amplifikační přímý test Mycobacterium tuberculosis
BCG	bacil Calmette-Guérin
BK	bacil Kochův
Bp	base pairs, párů bází
C (S)	citlivý (susceptible)
CD	Cluster of differentiation, diferenciační skupina povrchových glykoproteinů
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
CFP-10	10 kDa culture filtrate protein, 10 kDa kultivační filtrátový protein
CIP	ciprofloxacin
CLogP	teoreticky vypočítaný rozdělovací koeficient
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute, Institut klinických a laboratorních standardů
COVID-19	coronavirus disease 2019, koronavirové onemocnění 2019
CT	Computed Tomography, počítačová tomografie
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTB	detekční test BD ProbeTec ET

EEA ₁	Early Endosomal Autoantigen 1, včasný endozomální autoantigen 1
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Enzymatický imunosorbentní test
ESAT-6	6 kDa early secretory antigenic target, 6 kDa raně sekreční antigenní cíl
ESX	export pathway, exportní systém
EU	Evropská unie
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti
HDP	hrubý domácí produkt
HIV	Human immunodeficiency virus, vir lidské imunodeficience
I	intermediární citlivost
IGRA testy	Interferon-gamma release assay, testy uvolňování interferonu γ
IL-2, IL-12	interleukin, 2, 12
INF- γ	interferon gama
INH	isoniazid
IS 6110	inzerční sekvence 6110
Kb	kilobazí
LAM	lipoarabinomanan
LED	Light-Emitting Diode, elektroluminiscenční světelná dioda
LM	lipomanan
m/z	poměr hmotnosti a náboje

MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight, Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu
MDR	multidrug resistant, multirezistence
MHC	Major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MPI	manosylfosfát inositol
MTD	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Direct
MW	molecular weight, molekulová hmotnost
NALC	<i>N</i> -acetyl-L-cystein
NK	nukleová kyselina
NK buňky	natural killer cells, přirození zabíječi
NTM	netuberkulózní mykobakterie
OD	optická denzita
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce
PIM	fosfatidylinositol manosidy
PPD	purified protein derivatives, čištěný proteinový derivát
Pvu II	endonukleáza purifikovaná z kmene <i>Escherichia coli</i> , který nese gen Pvu II z <i>Proteus vulgaris</i>
R	rezistentní
RIF	rifampicin
RR	rezistence na rifampicin
RS	Ramanova spektroskopie
SERS	Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

TAT	twin arginine translocation, systém translokace dvojitého argininu
TBC	tuberkulóza
T _C buňky	cytotoxické T-lymfocyty
TDM	trehalózo-6,6-dimykolát
T _{H1} lymfocyty	pomocné T-lymfocyty 1
TNF- α	tumor necrosis factor α
UV	ultrafialové záření
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace
XDR	extensively drug resistant, rozsáhlá rezistence

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Složení buněčné stěny mykobakterií.....	11
Obrázek 2 <i>Mycobacterium kansasii</i> , příklad pomalu rostoucích fotochromogenních mykobakterií. ...	15
Obrázek 3 <i>Mycobacterium gordonae</i> , příklad pomalu rostoucích skotochromogenních mykobakterií.	15
Obrázek 4 <i>Mycobacterium fortuitum</i> , příklad rychle rostoucích nechromogenních mykobakterií.	16
Obrázek 5 Morfologie <i>M. tuberculosis</i>	17
Obrázek 6 Langhansovy buňky	21
Obrázek 7 Plicní granulom.....	21
Obrázek 8 TBC kaverna	23
Obrázek 9 Odhadovaná míra výskytu TBC na 100 000 obyvatel v roce 2019	27
Obrázek 10 Země, které v roce 2019 zaznamenaly nejméně 100 000 případů TBC	27
Obrázek 11 Země (modře), u nichž byla v roce 2019 odhadována míra výskytu TBC nižší než 10 na 100 000 obyvatel.....	28
Obrázek 12 Procento dříve léčených případů TBC MDR/RR	29
Obrázek 13 Pozitivita kožního tuberkulinového testu.....	31
Obrázek 14 Rentgen hrudníku před (a) a po léčbě (b)	32
Obrázek 15 <i>M. tuberculosis</i> v preparátu barveném dle Ziehl-Neelsena.....	34
Obrázek 16 Fluorescenční barvení <i>M. tuberculosis</i>	35
Obrázek 17 Růst <i>M. tuberculosis</i> na Löwensteinově-Jensenově půdě.....	37
Obrázek 18 Radiometrický kultivační systém BACTEC 460 TB	38
Obrázek 19 Kultivační systém BBL MGIT 960.....	38
Obrázek 20 Schématické znázornění mykobakteriální sekvence IS 6110	40
Obrázek 21 Testovací sada QuantiFERON®-TB Gold	42
Obrázek 22 Imunochromatografický LAM test	44
Obrázek 23 Dělení zemí na základě doporučení očkování BCG.	50
Obrázek 24 Schéma mikrotitrační destičky.....	54
Obrázek 25 Změna resazurinu na resorufin v živých buňkách	56
Obrázek 26 Multidetekční reader Synergy HTX (BioTek, Winooski, Spojené státy americké).....	56
Obrázek 27 <i>M. smegmatis</i> rostoucí na agaru Middlebrook 7H9	57
Obrázek 28 <i>M. aurum</i> rostoucí na agaru Middlebrook 7H9.....	58
Obrázek 29 <i>M. tuberculosis</i> H37Ra rostoucí na agaru Middlebrook 7H9	59
Obrázek 30 Struktura rifampicinu (RIF).....	59
Obrázek 31 Struktura ciprofloxacinu (CIP)	60
Obrázek 32 Struktura isoniazidu (INH)	60

12 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled častěji se vyskytujících mykobakterií a jejich patogenita pro člověka, rozdělení podle rychlosti růstu a podle pigmentace kolonií.....	14
Tabulka 2 Přehled antituberkulotik	45
Tabulka 3 Testované látky v 1. sérii.....	61
Tabulka 4 Testované látky v 2. sérii.....	64
Tabulka 5 Testované látky v 3. sérii.....	68
Tabulka 6 Výsledky testování první skupiny látek 1. série.....	71
Tabulka 7 Výsledky testování druhé skupiny látek 1. série	72
Tabulka 8 Výsledky testování první skupiny látek 2. série.....	72
Tabulka 9 Výsledky testování druhé skupiny látek 2. série	73
Tabulka 10 Výsledky testování látek 3. série.....	74
Tabulka 11 Výsledky testování standardů ve všech sériích	75

13 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Závislost MIC na ClogP u látek 1. série působících na <i>M. smegmatis</i>	79
Graf 2 Závislost MIC na ClogP u látek 1. série působících na <i>M. aurum</i>	79
Graf 3 Závislost MIC na ClogP u látek 1. série působících na <i>M. tuberculosis</i>	80
Graf 4 Závislost MIC na ClogP u látek 3. série působících na <i>M. smegmatis</i>	82
Graf 5 Závislost MIC na ClogP u látek 3. série působících na <i>M. aurum</i>	83
Graf 6 Závislost MIC na ClogP u látek 3. série působících na <i>M. tuberculosis</i>	84

14 POUŽITÁ LITERATURA

ABAY, F., YALEW, A., SHIBABAW A. a B. ENAWGAW. Hematological Abnormalities of Pulmonary Tuberculosis Patients with and without HIV at the University of Gondar Hospital, Northwest Ethiopia: A Comparative Cross-Sectional Study, *Tuberculosis Research and Treatment*. [online]. 2018; [cit. 2020-12-13]. DOI: 10.1155/2018/5740951. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6332918/>

ANONYMOUS. Acid fast bacilli stained with Ziehl-Neelsen stain, *Annals of Tropical Medicine and Public Health*. [cit. 2021-02-20]. Dostupné z: https://www.atmph.org/viewimage.asp?img=AnnTropMedPublicHealth_2011_4_2_110_85763_f3.jpg

ANONYMOUS. AlamarBlue Cell Viability Reagent, Thermo Fisher Scientific. [cit. 2021-01-12]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DAL1025#/DAL1025>

ANONYMOUS. Antibiotika ovlivňující syntézu buněčné stěny, Morfologie buněčné stěny - *Mycobacterium* sp. [cit. 2020-10-11]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.xf.cz/files/atb-bunecna-stena.doc.html>

ANONYMOUS. BACTEC TB-460 Radiometric culture system, model 460. [cit. 2021-02-22]. Dostupné z: <https://www.bidspotter.com/en-us/auction-catalogues/bscbo1/catalogue-id-bscbo110019/lot-688b6a9a-7ba3-43a8-959f-a497012a94b2>

ANONYMOUS. BBL MGIT 960. [cit. 2021-02-22]. Dostupné z: <https://www.trios.cz/pristroje/becton-dickinson/bd-bactec-mgit/>

ANONYMOUS. Ciprofloxacin, MedChemExpress. [cit. 2021-01-16]. Dostupné z: <https://www.medchemexpress.com/Ciprofloxacin.html>

ANONYMOUS. Isoniazid, A Smart Chem-Search Engine. [cit. 2021-01-16]. Dostupné z: https://www.chemsrc.com/en/cas/54-85-3_832365.html

ANONYMOUS. Medical-Labs, Medical Laboratories Portal. [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: <http://www.medical-labs.net/giant-langhans-cell-and-mycobacterium-tuberculosis-2459/>

ANONYMOUS. MF31-RB, LED Fluorescence Microscope-Fluorescence Microscope - MSHOT. [cit. 2020-10-22]. Dostupné z: <http://www.mshot.com/index.php?a=show&m=Anlie&id=94>

ANONYMOUS. Microbiology in pictures. [cit. 2020-11-01]. Dostupné z: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/mycobacterium-tuberculosis-photos/mycobacterium-kansasii.html>

ANONYMOUS. Multidetekční reader Synergy HTX – BioTek. [cit. 2021-02-22]. Dostupné z: <https://www.ibiotech.cz/produkt/Synergy-HTX>

ANONYMOUS. *Mycobacterium tuberculosis* on Löwenstein-Jensen medium, Bacteria i Photos. [cit. 2021-02-20]. Dostupné z: <http://www.bacteriainphotos.com/Mycobacterium%20tuberculosis.html>

ANONYMOUS. Resazurin Cell Viability Assay. Canvax. [cit. 2021-01-12]. Dostupné z: <https://lifescience.canvaxbiotech.com/product/resazurin-cell-viability-assay/>

ANONYMOUS. Rifampicin, Chemical Book. [cit. 2021-01-16]. Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7474473.htm

ANONYMOUS. Velký lékařský slovník online. [online]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>

ANONYMOUS. World Health Organization, Global tuberculosis report 2020. [cit. 2020-12-02]. Dostupné z: <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/9789240013131-eng.pdf>

ANONYMOUS. World Health Organization, TB drug resistance types. [cit. 2020-11-20] Dostupné z: <https://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/types/en/>

ANONYMOUS. World Health Organization, Tuberculosis. [cit. 2020-12-01]. Dostupné z: https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1

BÁRTŮ, V. Tuberkulóza – infekční choroba v 21. století, *Medicina pro praxi*. [online]. 2008, 5(6), 245-248; [cit. 2021-01-10]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/06/03.pdf>

BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.

BOYLE, S. D. Tuberculosis, *Unitaid Diagnostics Technology Landscape 5th Edition*. [online]. 2017. [cit. 2020-10-27]. DOI: 10.13140/RG.2.2.32003.81441. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/318597311_Unitaid_Diagnostics_Technology_Landscape_5th_Edition_May_2017

BROOKS, F. G., CARROLL, C. K., BUTEL, S. J., MORSE, A. S., a T. A. MIETZNER. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 26th edition*. New York: McGraw-Hill Medical, 2013. Lange medical book. ISBN 978-0-07-181292-4.

COUTO, C., ROSSETI, S., SCHLAEN, A., HURTADO, E., D'ALESSANDRO, L., a D. A. GOLDSTEIN. Chronic Postoperative *Mycobacterium gordonae* Endophthalmitis in a Patient with Phakic Intraocular Lens, *Ocular Immunology and Inflammation*. [online]. 2013, 21(6), 491-494; [cit. 2020-11-01]. DOI: 10.3109/09273948.2013.824104. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/09273948.2013.824104>

CUEVAS, L. E., AL-SONBOLI, N., LAWSON, L., YASSIN, M. A., ARBIDE, I., AL-AGHBARI, N., SHERCHAND, J. B., AL-ABSI, A., EMENYONU, E. M., MERID, Y., OKOBI, M. I., ONUOHA, J. O., ASCHALEW, M., ASEFFA, A., HARPER, G., ANDERSON DE CUEVAS, R. M., THEOBALD, S. J., NATHANSON, C. M., JOLY, J., FARAGHER, B., SQUIRE, S. B. a A. RAMSAY. LED Fluorescence Microscopy for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Multi-Country Cross-Sectional Evaluation, *PLOS Medicine*. [online]. 2011. 8(7), 1-10; [cit. 2020-02-21]. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001057>. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001057>

ČERMÁK, P., AMLEROVÁ, J., SVOBODOVÁ, J., ULMANN, V. a I. ZEMANOVÁ. Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění. *Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP*. [online]. 2014. [cit. 2020-11-14]. Dostupné z: https://www.splm.cz/_download/0000016e-78d9-d7e2-a16e-7cffddf50000

DAVIS, CH. P. a J. R. BALENTINE. Tuberculosis, MedicineNET. [cit. 2021-03-15]. Dostupné z: https://www.medicinenet.com/tuberculosis_tb_facts/article.htm#tuberculosis_tb_facts

DE ALMEIDA, S. M., MALASPINA, A. C., FUJIMURA LEITE, C. Q. a M. H. FÉRES SAAD. Usefulness of 3'-5' IS6110-RFLP genotyping and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in a tertiary hospital: a retrospective study detecting unsuspected epidemiological events, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. [online]. 2019, 61(7). [cit. 2021-01-15]. DOI: 10.1590/s1678-9946201961051. Dostupné z:

https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-6110-insertion-sequence-IS-present-in-the_fig1_335764456

ECHEVERRIA-VALENCIA, G., FLORES-VILLALVA, S. a C. I. ESPITIA. Virulence Factors and Pathogenicity of *Mycobacterium*. *Mycobacterium - Research and Development*. [online]. 2017. [cit. 2020-11-19]. DOI: 10.5772/intechopen.72027. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/mycobacterium-research-and-development/virulence-factors-and-pathogenicity-of-mycobacterium>

ECKERT, A. a J. ARCHER. Antimicrobial resistance, *Centers for Disease Control and Prevention*. [cit. 2020-10-11]. Dostupné z: <https://news.un.org/en/audio/2020/11/1077952>

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility). Návod k odečítání bujónové mikrodiluce. 2020. [cit. 2021-01-12]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/MIC/Navod_k_odecitani_BMD_v_2.0_2020.pdf

FANG-LAN, Y., JAU-CHING, L., TSUNG-HAN, W., YI-LIN, L., CHIA-WEN, L., TZU-TING, C. a W. GIUENG-CHUENG. Isolation of *Mycobacterium Fortuitum* from BACTEC 9240 Blood Culture System: A Case Report, *Journal of Biomedical and Laboratory Sciences*. [online]. 2010, 22(2), 70-73; [cit. 2020-11-01] DOI:10.30046/JBLS.201006.0004. Dostupné z: <https://www.labmed.org.tw/upfiles/issues/201076151647.pdf>

FERNANDOVÁ, E., BIELKOVÁ, K. a H. MATĚJOVSKÁ-KUBEŠOVÁ. Tuberculosis in elderly in the Czech Republic, *Epidemiology, Microbiology, Immunology*. [online]. 2019. 68(4), 184-190; [cit. 2020-10-17]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/en/journals/epidemiology-microbiology-immunology/2019-4-13/tuberculosis-in-elderly-in-the-czech-republic-119840>

GOERING, R. V., DOCKRELL, H. M., ZUCKERMAN, M. A. a P. L. CHIODINI, JULÁK, J., ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák-Triton, 2016. ISBN 978-807-3879-280.

GREENWOOD, D., PEUTHERER, J. F. a R. C. B. SLACK. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169-365-0.

HARVEY, R. A., CHAMPE, P. C., FISHER, B. D. a W. A. STROHL. *Lippincott's illustrated reviews: Microbiology. 2nd ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Lippincott's illustrated reviews. ISBN 978-0-7817-8215-9.

HEINRICHS, M. T., MAY, R. J., HEIDER, F., REIMERS, T., KENNETH B, S., PELOQUIN, CH. A. a H. DERENDORF. *Mycobacterium tuberculosis* Strains H37ra and H37rv have equivalent minimum inhibitory concentrations to most antituberculosis drugs, *International Journal of Mycobacteriology*. [online]. 2018. 7(2), 156-161. [cit. 2021-02-25]. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_33_18. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29900893/>

HERMAN, P., FAUVILLE-DUFAUX, M., BREYER, D., VAN VAERENBERGH, B., PAUWELS, K., DO THI, CH. D., SNEYERS, M., WANLIN, M., SNACKEN, R. a W. MOENS. Biosafety Recommendations for the Contained Use of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates in Industrialized Countries. Division of Biosafety and Biotechnology, *Scientific Institute for Public Health*. [online]. 2006. [cit. 2020-11-02]. Dostupné z: https://www.biosafety.be/sites/default/files/mtub_final_dl.pdf

HO, M. M., SOUTHERN, J., KANG, H. N. a I. KNEZEVIC. WHO Informal Consultation on standardization and evaluation of BCG vaccines Geneva, Switzerland 22–23 September 2009, *Vaccine*. [online]. 2010. 28(43), 6945-6950; [cit. 2020-11-08]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.086>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10011084#!>

KAEWSEEKHAO, B., NUNTAWONG, N., EIAMCHAI, P., ROYTRAKUL, S., REECHAIPICHITKUL, W. a K. FAKSRI. Diagnosis of active tuberculosis and latent tuberculosis infection based on Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy, *Tuberculosis*. [online]. 2020. 121, 101916; [cit. 2020-11-06]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101916>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979219304627>

KŘEPELA, K. Diagnostika a léčba tuberkulózy dětí a mladistvých v ČR, *Pediatric pro praxi*. [online]. 2007. 8(4), 208–210; [cit. 2020-10-22]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2007/04/03.pdf>

LAWN, S. D. Point-of-care detection of lipoarabinomannan (LAM) in urine for diagnosis of HIV-associated tuberculosis: a state of the art review, *BMC Infectious Diseases*. [online]. 2012.

12(103); [cit. 2020-10-22]. DOI: 10.1186/1471-2334-12-103. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22536883/>

LING LIN, P. a J. L. FLYNN. The End of the Binary Era: Revisiting the Spectrum of Tuberculosis, *The Journal of Immunology*. [online]. 2018. 201(9), 2541-2548; [cit. 2020-11-19]. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800993>. Dostupné z: <https://www.jimmunol.org/content/201/9/2541>

LIPTÁKOVÁ, A., PREDNÝ, J., BUC, M., SLOBODNÍKOVÁ, L., JALILI, N., KRČMÉRY, V. a J. KOREŇ. *Lekárska mikrobiológia*. Bratislava: Herba, 2019. Diešková edícia. ISBN 978-80-89631-91-9.

MACELA, A. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. Praha: Grada, 2006. Malá monografie (Grada). ISBN 8024706644.

MANGWANI, N., SINGH, P. K. a V. KUMAR. Tuberculosis Medicinal plants: Adjunct treatment to tuberculosis chemotherapy to prevent hepatic damage, *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. [online]. 2020. 11(4), 522-528; [cit. 2020-11-19]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2019.02.004>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0975947618307058#bib5>

MARTIN, C., AGUILO, N. a J. GONZALO-ASENSIO. Vaccination against tuberculosis, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Edition)*. [online]. 2018. 36(10), 648-656; [cit. 2020-11-11]. DOI: 10.1016/j.eimce.2018.07.011. Dostupné z: <https://www.elsevier.es/en-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-english-428-pdf-S2529993X18301990>

MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S. a M. A. PFALLER. *Medical microbiology. 7th ed.* Philadelphia: Elsevier/Saunders, c2013. ISBN 978-0-323-08692-9.

PEEK, J., XU, J., WANG, H., SURYAVANSHI, S., ZIMMERMAN, M., RUSSO, R., PARK, S., PERLIN, D. S. a S. F. BRADY. A Semisynthetic Kanglemycin Shows *In Vivo* Efficacy against High-Burden Rifampicin Resistant Pathogens, *ACS Infectious Diseases*. [online]. 2020. 6(9), 2431-2440; [cit. 2020-12-04]. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00223>. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00223>

PERNICOVÁ, E. Tuberkulóza jako stálá hrozba. *Centrum Očkování a cestovní medicíny Avenir*. [online]. 2020. [cit. 2020-10-22]. Dostupné z: <https://odbornost.avenir.cz/cz/tuberkuloza-jako-stala-hrozba>

PETRÁŠ, M. a I. KRÁLOVÁ LESNÁ. Očkování proti tuberkulóze. 2016. [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: https://www.vakciny.net/doporucene_ockovani/TBC.htm

PHELAN, J., MAITRA, A., MCNERNEY, R., NAIR, M., GUPTA, A., COLL, F., PAIN, A., BHAKTA, S. a T. G. CLARK. The draft genome of *Mycobacterium aurum*, a potential model organism for investigating drugs against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *International Journal of Mycobacteriology*. [online]. 2015. 4(3), 207-216; [cit. 2021-01-16]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.05.001>.

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212553115000783>

PTÁKOVÁ, M. Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterióz. *Medicína pro praxi*. [online]. 2011. 8(11), 466-468; [cit. 2020-10-22]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/11/06.pdf>

SCHARFEN, J. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK, 2013. ISBN 978-80-87009-32-1.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence, *Clinical Microbiology Reviews*. [online]. 2003. 16(3), 463-496; [cit. 2020-10-19]. DOI: 10.1128/CMR.16.3.463-496.2003. Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164219/>

SOUČKOVÁ, L. a A. RUZSÍKOVÁ. Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu. *Klinická farmakologie a farmacie*. [online]. 2016. 30(3), 23-28; [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2016/03/06.pdf>

SUÁREZ, I., FUNGER, S. M., KROGER, S., RADEMACHER, J., FATKENHEUER, G. a J. RYBNIKER. Diagnostik und Therapie der Tuberkulose, *Deutsches Ärzteblatt International*. [online]. 2019. 116, 729-35; [cit. 2020-10-29]. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0729. Dostupné z: <https://www.aerzteblatt.de/int/archive/article/210460>

SUNDARSINGH, J. A. T., JAMBULINGAM, R., RAJAN, A. a V. SHANKAR. Resazurin Cell Viability Assay Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible

model for *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Infection and Public Health*. [online]. 2020. 13(9), 1255-1264; [cit. 2021-01-16]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.023>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034120305530?via%3Dihub#!>

SUWANPIMOLKUL, G., KAWKITINARONG, K., MANOSUTHI, W., SOPHONPHAN, J., GATECHOMPOL, S., OHATA, P. J., UBOLYAM, S., IAMPRONSIN, T., KATERATTANAKUL, P., AVIHINGSANON, A. a K. RUXRUNGTHAM. Utility of urine lipoarabinomannan (LAM) in diagnosing tuberculosis and predicting mortality with and without HIV: prospective TB cohort from the Thailand Big City TB Research Network, *International Journal of Infectious Diseases*. [online]. 2017. 59, 96-102; [cit. 2020-11-10]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.04.017>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971217301297>

ŠTEFÁNEK, J. Plicní tuberkulóza. *Medicína, nemoci a studium na 1. LF UK*. [cit. 2021-01-15]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/?q=nalez-36-plicni-tuberkuloza>

ŠTIMAC, A., ŠEKUTOR, M., MLINARIČ-MAJERSKI, K., FRKANEC, L., a R. FRKANEC. Adamantane in drug delivery systems and surface recognition. *Molecules*. [online]. 2017. 22(2), 297; [cit. 2021-05-01]. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22020297>. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/2/297/htm>

TALBOT, E. A. a B. J. RAFFA. *Mycobacterium tuberculosis*, *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. [online]. 2015. 3, 1637-1653; [cit. 2020-10-20]. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00092-5>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123971692000925>

TROMBONE, A. P. F., PEDRINI, S. C. B., DIÓRIO, S. M., BELONE, A. F. F., FACHIN, L. R. V., DO NASCIMENTO, D. C. a P. S. ROSA. Optimized Protocols for *Mycobacterium leprae* Strain Management: Frozen Stock Preservation and Maintenance in Athymic Nude Mice, *Journal of Visualized Experiments*. [online]. 2014. 85; [cit. 2021-02-02]. DOI: 10.3791/50620. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4155980/>

ÚZIS. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v ČR v roce 2018 a 2019. [cit. 2020-10-18]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=vystupy--vyznamna-temata--tuberkuloza>

VAŠÁKOVÁ, M., HRICÍKOVÁ, I. a E. KOPECKÁ. Současný přístup k diagnostice a léčbě tuberkulózy, *Remedia*. [online]. 2016. 3; [cit. 2020-10-22]. Dostupné z:

<http://www.remédia.cz/Okruhy-temat/Respiracni-onemocneni/Soucasny-pristup-k-diagnostice-a-lecbe-tuberkulozy/8-1o-25o.magarticle.aspx>

VERNON, A., FIELDING, K., SAVIC, R., DODD, L. a P. NAHID. The importance of adherence in tuberculosis treatment clinical trials and its relevance in explanatory and pragmatic trials, *PLOS Medicine*. [online]. 2019. 16(12); [cit. 2020-11-18]. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002884>. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6903706/>

VINUELAS-BAYÓN, J., ASUNCIÓN VITORIA, M. a S. SAMPER. Rapid diagnosis of tuberculosis. Detection of drug resistance mechanisms, *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)*. [online]. 2017. 35(8), 518-526; [cit. 2020-10-29]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2017.08.009>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2529993X17302150>

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-7.

WALLENFELS, J., VAŠÁKOVÁ, M. a I. SOLOVIČ. Aktuální farmakoterapie tuberkulózy, *Klinická farmakologie a farmacie*. [online]. 2018. 32(4), 10-14; [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/far/2018/04/02.pdf>

ZHANG, R., LONG, Y., HE, W., HAO, X. a J. LIU. Application status of MALDI-TOF mass spectrometry in the identification and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, *The Journal of Thoracic Disease*. [online]. 2014. 6(5), 512-516; [cit. 2020-10-28]. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.02.19. Dostupné z: <https://jtd.amegroups.com/article/view/2348/html>