

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

Laboratorní diagnostika mykobaktérií
(Bakalářská práce)

Hradec Králové, 2008

Vaněková Jana

Obsah

1 Úvod.....	5
2 Historie boje proti tuberkulóze.....	7
3 Všeobecně o mykobaktériích	8
3.1 Dělení mykobaktérií	8
3.2 Morfologie.....	9
3.3 Expozice nákaze	10
3.4 Přenos a zdroj infekce.....	10
3.5 Patogeneze	11
3.5.1 Průběh tuberkulózního procesu	11
3.5.2 Projevy tuberkulózní infekce	12
4 Laboratorní diagnostika mykobaktérií	16
4.1 Druhy materiálu a odběr	16
4.2. Mikroskopický průkaz	17
4.3 Kultivační průkaz	18
4.4 Biologický pokus.....	22
4.5 Metody založené na měření metabolických produktů mykobaktérií.....	22
4.6 Molekulárně genetické techniky.....	23
4.7 Nepřímý důkaz mykobaktérií	24
4.8 Histologický průkaz tuberkulózy	24
4.9 Průkaz sérových protilátek.....	24
5 Identifikační metody	25
5.1 Screening	25
5.2 Identifikace	26
6 Testování citlivosti na antituberkulotika.....	28
7 Terapie.....	30
Tab.4 Mechanismus účinku antituberkulotik	32
8 Dohled nad tuberkulózou	34
9 Závěr	36
10 Přílohy	37
11 Zkratky	39
12 Použitá literatura	40

Touto cestou chci vyjádřit poděkování Mgr. Marcele Vejsové za její trpělivost, rady a odbornou pomoc, kterou mi poskytla a volný čas, který mi obětovala, aby mi pomohla s mojí prací.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

1 Úvod

Tuberkulóza je staronovou infekcí, která se šířila po celém světě a připravila o život mnoho lidí. Neohrožuje jen tzv. rozvojový svět, ale stále víc i vyspělé země. Počet nových tragických případů se zvyšuje i u nás a nejsme zcela ochráněni ani očkovaním. Navíc se objevují nové kmeny bakterií, které odolávají dosud užívaným antibiotikům.

Ještě v polovině 19. století měla tuberkulóza (lidový název souchotiny či úbytě) na svém kontě asi čtvrtinu celkového počtu úmrtí. Byla hlavní příčinou smrti dětí a mladých lidí. Jejího původce – *Mycobacterium tuberculosis hominis* - odhalil v roce 1882 Robert Koch, podle něhož dostal mikrob název Kochův bacil. Dokáže zasáhnout jakýkoli orgán v těle. Nejčastější formou je tuberkulóza plic. Původce způsobuje zvláštní formu zánětu, při kterém vznikají tuberkulózní uzlíky. Ty vytvářejí vyprázdněním zkapalněného tuberkulózního ložiska chorobné dutiny, tzv. kaverny, a mohou způsobit i odumření orgánů. Při tuberkulóze plic dochází k rozpadu plicní tkáně. Neléčená tuberkulóza bývá smrtelná.

V 50. letech 20. století byly vyzkoušeny léky proti tuberkulóze a v rozsáhlém měřítku se uskutečnila jejich klinická aplikace. Tím se šíření této nemoci do určité míry dostalo pod kontrolu. Avšak v posledních letech se z různých příčin objevily náznaky zvyšování počtu případů onemocnění touto chorobou, což se stalo globální otázkou veřejného zdravotnictví.

Tuberkulózní infekcí je infikována jedna třetina současné populace. Až 90% infikovaných osob pochází z rozvojových zemí, které mají limitované ekonomické i odborné zdroje. Kromě toho ovlivnily vývoj tuberkulózy ve světě i jiné nepříznivé skutečnosti. Svoji úlohu hraje i infekce HIV (Human Immunodeficiency Virus). Předpokládá se, že v blízké budoucnosti budou tuberkulóza a mykobakteriózy všeobecně hlavní příčinou smrti mezi HIV-positivními osobami. Virus HIV likviduje postupně celulární imunitu hostitele a připravuje pro mykobakteria ideální terén. Nemocní AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) jsou pro tuberkulózu velmi vnímaví, jejich riziko nákazy je 157 krát vyšší oproti zdravé populaci.

Dalším faktorem, který významně zasáhl do vývoje tuberkulózy ve světě, je problém imigrantů a běženců. Migrace obyvatelstva z rozvojových zemí

s vysokou mírou incidence tuberkulózy do vyspělých zemí má závažné důsledky – přenos tuberkulózy v hostitelské zemi.(Homolka J. a Votava V., 2003)

V neposlední řadě nepříznivě ovlivňuje vývoj tuberkulózy ve světě rychlý rozvoj rezistence na antituberkulotika. Základním předpokladem úspěšné léčby tuberkulózy je totiž důsledná kontrolovaná a adekvátní léčba antituberkulotiky. Při nedodržení těchto samozřejmých požadavků začaly přibývat kmeny rezistentní na antituberkulotika podávaná v současnosti.

K těmto skutečnostem přispívá i zhoršení sociální situace některých vrstev obyvatelstva. S pokračující privatizací zdravotnických zařízení, lékaři z ekonomických příčin ztrácejí zájem vyhledávat, léčit a dispenzarizovat nemocného s tuberkulózou.

U laické veřejnosti i některých lékařů se opakovaně setkáváme s názory, že většina nových onemocnění je zachycena v rámci preventivních prohlídek. Dochází tím k oslabení diagnostické bdělosti u lékařů v ambulantních i lůžkových zařízeních. Při symptomech jako jsou kašel, hemoptýza, únavnost, nechutenství, hubnutí musí každý lékař do své diferenciálně - diagnostické rozvahy zahrnout možnost tuberkulózy jako příčiny potíží nemocného. V nejasných případech je lépe zahájit podávání antituberkulotik, než nechat nemocného zemřít na nepoznanou tuberkulózu.

V současné době by nemusel nikdo na tuberkulózu zemřít, pokud je na tuto diagnózu včas pomyšleno a včas zahájena léčba. Bohužel ve skutečnosti v České republice každoročně několik jedinců na nepoznanou nebo velmi pozdě diagnostikovanou tuberkulózu zemře.

Mnohé z uvedených problémů jsou takového charakteru, že není možno je jednoznačně a krátkodobě řešit. Je tragické, když se nevyužívají všude a dostatečně možnosti, které jsou v současné době k dispozici a které by mohly problém tuberkulózy pozitivně ovlivnit (Bajan A., 1990)

2 Historie boje proti tuberkulóze

Tuberkulóza je i v současné době sociální chorobou. Pro svoji zákeřnost a hromadný výskyt je sledována odděleně od ostatních infekčních chorob. V roce 1905 bylo otevřeno první české sanatorium ve Vamberku. Situace po skončení 1. světové války byla hrozná. V roce 1918 byla mortalita v Čechách 360/100 000 obyvatel, v Praze dokonce 400/100 000 obyvatel. V období mezi 1. a 2. světovou válkou se na zajišťování léčby i na některých preventivních opatřeních podílela pouze charitativní organizace – Masarykova liga proti tuberkulóze, která byla založena roku 1919.

Ještě v roce 1940 umíralo ročně 140 lidí ze 100 000 obyvatel na tuberkulózu. V březnu roku 1948 bylo uzákoněno povinné hlášení tuberkulózy. Tak bylo možno zjistit rozsah tuberkulózní epidemie v populaci. Zavedením povinné kalmetizace v roce 1953 ubylo závažných forem tuberkulózy hlavně u dětí. V terapii byla používána trojkombinace antituberkulotik kontinuálně po dobu 12 měsíců.

V 80. letech bylo do léčby tuberkulózy zavedeno dosud nejúčinnější antituberkulotikum Rifampicin. Na základě studií v rozvojových zemích byla zkracována délka chemoterapie a zkoušeny krátkodobé režimy čtyřkombinací antituberkulotik v denním nebo intermitentním podáváníí. Jako zdroj infekce je eliminováno *Mycobacterium bovis*. Postupně byly do praxe zavedeny krátkodobé režimy využívající synergických účinků čtyřkombinace antituberkulotik na různé části populace mykobaktérií. Byl redukován počet preventivních vyšetření pro tuberkulózu a vytvořen Registr tuberkulózy, který slouží k rychlému a pohotovému dohledu nad tuberkulózou. (Homolka J. a Votava V., 2003)

3 Všeobecně o mykobaktériích

Původcem tuberkulózy je Kochův bacil - *Mycobacterium tuberculosis*. Do rodu *Mycobacterium* patří bakterie neobvyklých morfologických a kultivačních vlastností. Spadají sem původci tuberkulózy a lepry. Jsou to chronické infekce, v jejichž patogenезi hrají podstatnou roli reakce makroorganismu a celulární imunita. (Votava M., 2003)

3.1 Dělení mykobaktérií

1. Pravá mykobakteria - obligatorně patogenní pro člověka

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium bovis

Mycobacterium africanum

Mycobacterium microti

Tato mykobakteria vytváří tzv. tuberkulózní komplex. Nejdůležitějším a nejčastějším příčinným agens tuberkulózy je *Mycobacterium tuberculosis (hominis)*.

2. Mykobakteria jiná než původce tuberkulózy - netuberkulózní mykobakteria.

Tato skupina zahrnuje řadu neobvyklých agens, která jsou potenciálními patogeny pro člověka, nebo jsou pouhými lidskými saprofyty. Hodnotíme u nich způsob a rychlost růstu, vzhled kolonií, citlivost na světlo a optimální teplotu růstu. Fotochromogeny jsou mykobakteria pigmentující jen na světle, skotochromogeny rostou v barevných koloniích i potmě. Nonchromogeny netvoří výrazně barevné kolonie a rychle rostoucí mykobakteria vyrostou během několika dnů.

Dle těchto kritérií a případně patogenity pro člověka lze netuberkulózní mykobakteria třídit do 4 skupin (viz Tab.1):

Tab. 1 Rozdělení mykobakterií dle patogenity

Skupina	Potenciální patogeny	Nepatogenní (zřídka)
I. fotochromogeny pomalu rostoucí	<i>M.kansasii</i> , <i>M.marinum</i> <i>M.simiae</i> , <i>M.asiaticum</i>	
II. skotochromogeny pomalu rostoucí	<i>M.scrofulaceum</i> , <i>M.szulgai</i> <i>M.xenopi</i>	<i>M.gordonae</i> <i>M.flavescens</i>
III. non-fotochromogeny pomalu rostoucí	<i>M.avium-intracelulare</i> <i>M.ulcerans</i> , <i>M.malmonensae</i> <i>M.haemophilum</i> , <i>M.shimoidei</i>	<i>M.terrae</i>
IV. rychle rostoucí	<i>M.fortuinum</i> , <i>M.chelonei</i>	<i>M.smegmatis</i> , <i>M.phlei</i>

3.2 Morfologie

Mykobakteria jsou nepohyblivé, nesporulující, většinou štíhlé, acidorezistentní tyčinky. Cytoplazma mykobaktérií je homogenní prostoupená různě velkými granuly a vakuolami.

Stavba buněčné stěny je poměrně složitá, na vrstvu peptidoglykanu jsou postupně navázány polysacharid arabinoglykan a mykolové kyseliny. Hydrofóbní zevní vrstva obsahuje rozmanité lipidy a polypeptidy stimulující buněčnou imunitu. (Votava M., 2003)

Mykobakteria jsou anaerobní a mnohá se vyznačují dlouhou generační dobou - několik hodin až jeden den. Dělení mykobaktérií probíhá příčným a podélním dělením, někdy dokonce pučením mateřské buňky. Rostou ve virulentních kulturách v charakteristických útvarech – cord-formacích, které vytváří hodně tuberkulózních paliček vedle sebe. Tvorbu těchto útvarů umožňuje toxická hlenovitá substance lipidního charakteru cord-faktor. (Bajan A., 1990)

Některá mykobakteria rostou při 37°C, jiná dávají přednost teplotám až 45°C. *Mycobacterium leprae* se zatím mimo živé buňky pěstovat nepodařilo. Kolonie se na kultivační půdě objeví až za několik týdnů. Jsou žlutavě pigmentovány a mívají drsný povrch.

Mykobakteria jsou poměrně odolná na zevní vlivy, zejména na vysychání a chemické látky. (Votava M., 2003)

3.3 Expozice nákaze

Lidé jsou pravidelně vystaveni styku s tuberkulózní infekcí. Pravidelně jsou vystaveni nákaze děti žijící v rodinách, kde jeden z rodičů, prarodičů nebo spolubydlících trpí na nakažlivou formu tuberkulózy. Za těchto okolností je to expozice familiární.

Někteří lidé jsou vystaveni ve zvýšené míře nákaze při výkonu svého povolání. Patří sem zdravotničtí pracovníci, dále veterináři a ošetřovatelé zvířat. Expozici označujeme jako profesionální.

Infekce se může šířit také u lidí společně ubytovaných na kolejích v nebo v táborech. Tuberkulóza může vzniknout i po náhodném styku s zdrojem nákazy v kině, divadle nebo dopravním prostředku a jiných uzavřených prostorech, kde nemocný nedodrhuje při kašli, řeči nebo kýchání hygienické zásady. (Bajan A., 1990)

3.4 Přenos a zdroj infekce

V současné době je zdrojem nákazy nemocný člověk, méně domácí a hospodářská zvířata. Tuberkulóza skotu (bovinní tuberkulóza) byla eliminována v r. 1968 likvidací infikovaných zvířat.

Přenos nákazy se uskutečňuje nejčastěji inhalační cestou – vdechováním mykobaktérií ulpívajících v infikovaném bronchiálním sekretu při přímém kontaktu s nemocným.

Nebo přímým kontaktem – obvykle profesionálního původu u veterinárních pracovníků, nebo pracovníků na pitevnách. Nejčastější branou vstupu a nejčastější orgánovou lokalizací tuberkulózy jsou plíce. (Homolka J. a Votava V., 2003)

Při tuberkulóze trávicího ústrojí může být infekční materiál stolice, při infekci ledvin moč, nebo při tuberkulóze genitálií kontaminovaný sekret. Méně častý způsob přenosu je výměšky tuberkulózních ulcerací na kůži, nebo z pustulí při postižení uzlin. Někdy může být infikována menstruační krev při tuberkulózní endometritidě.

3.5 Patogeneze

Při infekci člověka mykobaktériemi vznikají v jeho organismu dvě základní imunitní odpovědi. První je vytvoření určitého projevu získané imunity proti infekci, druhou je tuberkulinová hypersenzitivita. Obě reakce jsou v podstatě celulárního charakteru zprostředkované hlavně T - lymfocyty.

Změny imunitní odpovědi mají ve vývoji tuberkulózního onemocnění významnou úlohu, jejich vzájemný vztah a projev u infikované osoby determinuje průběh – progresi a projev – manifestaci onemocnění.

3.5.1 Průběh tuberkulózního procesu

Původci tuberkulózy po vniknutí do tkáně způsobují její poškození. Tkáň na toto poškození reaguje exsudativním zánětem, při kterém nastává zvýšené prokrvení postižené části tkáně. Začíná se tvořit exudát, jehož množství závisí na závažnosti toxického poškození a anatomickém charakteru tkáně. Za příznivých imunitních okolností se může exudát vstřebat – resorpce. V tomto stadiu je proces reverzibilní a exudací může začínat i končit.

Při množení mykobaktérií probíhá degenerativní proces – kazeifikace, který je pro tuberkulózu charakteristický. Vzniká kazeum, ve kterém se mykobakteria namnoží a po jejich rozpadu se uvolní substance lipidové povahy. Tyto substance transformací z makrofágů vyvolávají tvorbu epitelových buněk a obrovských Langerhansových buněk. Tyto buňky spolu s lymfocyty vytvářejí specifickou granulační tkáň. V tomto případě se jedná o produktivní proliferační fázi – granulaci.

Když se granulační val uzavře fibroblasty s kolagenními vlákny, vytvoří kolem kazeózního ložiska pouzdro. Do pouzdra se pak mohou ukládat fosforečnany a uhličitany vápenaté a ložisko kalcifikuje. V případě, že ložisko není resorbované ani kalcifikované bývá nahrazeno granulační tkání a vzniká tuberkulózní granulom.

Nepříznivou modifikací kazeózního ložiska je jeho zkapalnění – kolikvace. Při tomto procesu zároveň dochází ke značnému množení tuberkulózních bacilů. Vylučování zkapalněného kazea je závažným projevem, jehož následkem je rozsev infekce do zdravé okolní tkáně. Jako projev rozpadu se vytvářejí kaverny, v nichž jsou příznivé podmínky pro růst mykobaktérií, se kterými organismus není schopen úspěšně bojovat.

Fáze tuberkulózního procesu se mohou vzájemně prolínat, přičemž rozsah a průběh procesu závisí na množství a virulenci infikujících mykobaktérií, odolnosti a rezistenci hostitele. Důležitá je schopnost makrofágů fagocytovat, na které závisí, zda nastane intracelulární množení mykobaktérií, nebo bakteriostáza a přechod do klidové formy. (Bajan A., 1990)

3.5.2 Projevy tuberkulózní infekce

Způsob, jakým se projeví infekce tuberkulózními mykobakteriemi, závisí na terénu, na kterém mykobakteria parazitují. Infekce může postihnout člověka, který ještě nepřišel do styku s tuberkulózním bacilem, nebo jedince, který už byl infikovaný a překonal onemocnění, nebo byl očkován vakcínou BCG (Bacillus Calmette Guérin).

Primární tuberkulózní infekce

Jde o infekci u člověka, který nebyl ještě v žádném styku s tuberkulózním bacilem.

Protože infekce nejčastěji vzniká inhalační cestou, prvním postiženým orgánem jsou plíce, ve kterých se projevy onemocnění vyskytují nejčastěji. Při primární infekci se jedna nebo více mykobaktérií usadí v alveolách, kde mohou být fagocytovány. Virulentní mykobakteria mají vysokou rezistenci proti destrukci a v makrofázích se rychle množí. Když je tuberkulózních bacilů určité množství, projeví se zánětlivá buněčná reakce. Primární infekce má charakter zánětlivého pneumonického procesu.

I když se vytváří celulózní reakce, je rezistence proti pomnožování mykobaktérií malá nebo žádná. Ze vzniklého ložiska dochází k rozsevu krevní nebo lymfatickou cestou. Nejčastěji jsou postiženy regionální hylové lymfatické uzliny. Tak vzniká primární ložisko. Primární komplex se může biologicky zahojit opouzdřením nebo zvápenatěním.

Když nastane provalení infekce z lymfatického do krevního řečiště, dojde k hematogennímu rozsevu. Důsledkem toho vznikají v plicích a ostatních orgánech hematogenní metastázy. Tento projev se nazývá včasná hematogenní diseminace.

U malého počtu jedinců s takto probíhající primární infekcí může chorobný proces pokračovat dál, a když se nenasadí adekvátní léčba následuje

i smrt. Ve většině případů však nastanou za několik dní nebo týdnů příznivé změny. Množení mykobaktérií se markantně snižuje, pneumonický proces se resorbuje a diseminace krevní a lymfatickou cestou ustane.

Současně s těmito změnami se objevují během procesu dvě imunitní manifestace.

První spočívá v tom, že postižený organizmus se stane tuberkulin pozitivní. Bude reagovat opožděnou hypersenzitivitou na aplikaci proteinů nebo polypeptidů nacházejících se v tuberkulózní bakterii.

Druhá změna se týká makrofágů, které získávají schopnost výrazně inhibovat množení virulentních tuberkulózních bakterií. Tuberkulózní bakterie nejsou schopny růst v buňkách, chorobný proces se zastavuje. Choroba se u postiženého jedince začíná stávat imunizovanou a tento typ imunity je známý jako aktivovaná celulární imunita.

Pozdní primární tuberkulózní infekce

Jedinec je postižený tuberkulózní infekcí v pozdějším věku a její průběh se liší od primární tuberkulózy v dětském věku. Při pozdní primární infekci nebývá uzlinová složka výrazná a onemocnění má od začátku tendenci k progresi, rozpadu a bronchogenním i hematogenním diseminacím.

Nejčastější časná manifestace infekce je exsudativní pleuritida. Při hematogenní diseminaci vznikají metastázy nejen v plicích, ale i kostní dřeni a ledvinách. Tyto se můžou projevit až po několikaleté latenci.

Postprimární tuberkulózní infekce

Tato infekce vzniká u pacienta, který už byl předtím infikován. Při jejím vzniku může působit několik mechanismů.

Za mimořádně nepříznivých podmínek může postprimární tuberkulóza vzniknout přímým přechodem primární tuberkulózy, při oslabení organismu, nebo pubertě.

Druhá možnost vzniku postprimární formy tuberkulózy je endogenní exacerbace. Jedná se o vzplanutí a šíření onemocnění ze staršího ložiska v těle, nejčastěji z hrotových částí plic. Exacerbace vzniká při celkovém oslabení organismu, po překonaném těžkém onemocnění, při chybění základních potravin, nebo při užívání léků snižujících odolnost organismu.

Exogenní superinfekce, představuje další způsob postprimární tuberkulózní infekce. Znamená novou infekci organismu v čase, kdy první infekce ještě neodezněla. Tato situace nastává výjimečně.

Exogenní reinfekce představuje novou infekci organismu v čase, kdy první infekce byla klinicky, anatomicky a biologicky zhojená. (Bajan A., 1990)

Při oslabené imunitě je reaktivace tuberkulózy nejvíce pravděpodobná u starých lidí, u pacientů po transplantaci a HIV - pozitivních osob, u nichž tuberkulózu mnohdy diagnostikují dřív, než se objeví první příznaky AIDS. Dutiny nevznikají, to potvrzuje význam imunitní reakce hostitele. Místo dutin vznikne v plicích difúzní infiltrát a hematogenní cestou vznikají infiltráty i jinde. Někdy se po celém těle vyvíjejí drobné léze, které jsou naplněny mykobakteriemi. Je to rychlá progredující a smrtelná forma tuberkulózy.

Postprimární infekce postihuje nejčastěji plíce, přičemž chorobný proces probíhá hlavně v apikálních a zadních segmentech horních laloků a v menší míře i v apikálních segmentech dolních laloků.

Během primární tuberkulózy nastává lymfohematogenní rozsev do různých orgánů, ve kterých se vytvoří minimální léze, které mohou reaktivovat po delším čase. Reaktivační proces nastává jen v jednom orgánu, přičemž plicní ložiska ani uzliny nebývají postiženy.

Nejčastěji postihuje postprimární tuberkulóza tyto orgány:

1. serózní blány
2. dutinu ústní, hrtan průdušnici
3. trávicí ústrojí
4. centrální nervový systém
5. uropoetický systém
6. pohlavní orgány
7. pohybové orgány
8. kůži
9. prsní žlázu
10. žlázy s vnitřní sekrecí

1. Tuberkulózní zápal seriózních blan - tuberkulózní pleuritida vznikne průchodem tuberkulózního procesu z plic nebo uzlin. Jsou známé dvě formy zápalu. Sérohemoragická u hypersenzitivních jedinců a suchá forma, po které nastává masivní fibróza se zvápenatěním. U obou forem se vyskytují pod

povrchem pleury v malém počtu tuberkuly. V těchto formách se vyskytuje i tuberkulózní perikarditida a peritonitida.

2. Tuberkulóza ústní dutiny, hrtanu a průdušnice vzniká u nemocných s plicní tuberkulózou v důsledku přímého kontaktu sliznic s vylučovanými mykobakteriemi. Nejčastěji se jedná o ulcerózní formy.

3. Tuberkulóza trávicího traktu vznikne při polknutí velkého počtu mykobakterií při tuberkulóze plic. Nejtypičtější je obraz ulcerózní enteritidy.

4. Při tuberkulóze centrálního nervového systému může vzniknout bazilární tuberkulózní meningoencefalitida s tuberklem mozku nebo míchy.

5. Tuberkulóza uropoetického systému nastane reaktivací ložisek jen v jedné ledvině v podobě ulcerózní pyelonefritidy s přechodem procesu do pánvičky. Vylučovaná mykobakteria mohou způsobit tuberkulózní uretritidu a cystitidu, které mohou způsobit ascendentní postižení druhé ledviny.

6. Tuberkulóza pohlavních orgánů vzniká reaktivací v nadsemeníku nebo vejcovodu, šíří se do semeníku a vaječníku a může postihnout i další pohlavní, případně i močové orgány.

7. Při tuberkulóze pohybového ústrojí se mykobakteria nejčastěji usídlí v kostní dřeni a metafýzách kostí. Reaktivací ložisek vznikne tuberkulózní osteomyelitida nebo periostitida. Ložiska se nacházejí v blízkosti kloubů a vyvíjí se tuberkulózní osteoartritida. V obratlech se reaktivace projeví jejich zhroucením. Další formou kostní tuberkulózy je postižení na člancích prstů.

8. Tuberkulóza kůže v postprimárním období se projevuje jako lupus s pestrou morfologií. Neurčitou ale pravděpodobně tuberkulózní gametu mají tuberkulidy a *erythema induratum bazin*.

9. Tuberkulózní zánět prsní žlázy se projevuje u žen jako kazeózní morózní forma s tvorbou fistul i jako sklerotická forma.

10. Tuberkulóza žláz s vnitřní sekrecí je poměrně zřídka a nejčastěji způsobuje jejich hypofunkci. Nejčastěji se vyskytuje oboustranní tuberkulózní kazeózní epinefritida. (Bajan A., 1990)

4 Laboratorní diagnostika mykobaktérií

4.1 Druhy materiálu a odběr

Sputum je materiálem volby při onemocnění dýchacího ústrojí. Odebírá se na lačno. Pacient vykašle hlubokým kašlem 2-5 ml sputa z dolních cest dýchacích. Nevykašlávající nemocný se vyzve, aby zakašlal při zavřených ústech a dodal alespoň sliny, kterými vypláchl po kašli dutinu ústní. Odběr provádíme do plastické jednorázové nádoby.

Indukované sputum se získává od nevykašlávajících nemocných po inhalaci solného roztoku (NaCl v destilované vodě 15g/100ml). Pacient vdechne aerosolový roztok a po 15-30 min. je vyzván k vykašlání sputa. Vzorek je nutné označit jako indukované sputum, neboť vzhledem může připomínat sliny a mohl by být v laboratoři vyřazen jako nevhodný k vyšetření.

Laryngeální výtěr se odebírá u osob, které nevykašlávají sputum. Odběr se provádí vatovým tamponem pevně namotaným na drátku z nerezavějící molybdenové oceli. Před odběrem se důkladně navlhčí ve sterilní destilované vodě. Při každém vyšetření se odebírají tři odběry nalačno. Nemocný při odběru sedí, drží si špičku jazyka sterilní gázou a zhluboka dýchá ústy. Tampon se zavede za kořen jazyka a nemocný je vyzván, aby zakašlal. Na povrchu tamponu ulpí kapénky sputa.

Tracheální a bronchiální výplach se získává po instilaci vlažného fyziologického roztoku do hrtanu případně do bronchů při bronchoskopii. Materiál se zpracovává stejně jako sputum.

Žaludeční výplach se odebírá na lačno žaludeční sondou. Obsah žaludku se nasaje do stříkačky, případně se do žaludku vstříkne 50 -100 ml vlažné destilované vody. Vzorek je nutno zpracovat nejpozději do 4 hodin po odběru, jinak je nutno výplach neutralizovat roztokem uhličitanu nebo fosforečnanu sodného.

Moč se odebírá ze středního proudu při ranním močení nebo cévkováním v množství 100 ml. Odběr se opakuje tři dni po sobě. Před zpracováním se přidají 1-2 kapky koloidního roztoku $\text{Al}(\text{OH})_3$, nebo tři kapky roztoku kys. sulfosalicylové a vzorek se centrifuguje při 1000-2000 otáčkách 20 min. Zpracovává se sediment.

Mozkomíšní mok, pleurální výpotky a punktáty se získávají při punkcích za aseptických podmínek v množství alespoň 3 ml. Při větším množství se vzorek koncentruje centrifugací na 2-5 ml podobně jako tracheální výplach. Tyto vzorky je možné inokulovat přímo do půdy bez dekontaminace. Vždy je však nutno část materiálu zpracovat dekontaminací.

Výtěry a stěry z píštělí, hnisavých procesů apod. se odebírají na zvlhčené laryngeální tampony, které se vytřepají do 2-5 ml. fyziologického roztoku a zpracovávají se obdobně jako punktáty.

Bioptický a sekreční materiál se obvykle získává oddělením části tkáně, která se paralelně vyšetřuje histologicky. Materiál se odebírá do sterilní nádoby bez přidání fixační nebo konzervační tekutiny. Tkáňové vzorky se v laboratoři homogenizují v třecí misce s přísadou sterilního jemného písku nebo sklené drtě nebo s pomocí mechanického tkáňového homogenizátoru. Stejným způsobem se zpracovávají i orgány pokusných zvířat.

Voda se odebírá v množství 0,5 l do sterilní láhve. Pitná nebo užitková voda ze sítě se nechá 3 – 5 min. odtékat, vzorek povrchové nebo odpadní vody se nabírá 30 – 40 cm pod hladinou. Doba mezi odběrem a vyšetřením by neměla přesáhnout 24 hod. Před zpracováním se nechá stát vzorek při laboratorní teplotě 12 – 24 hod, potom se supernatant odlije a zbytek vzorku v množství 6 -10 ml v původní láhvi se protřepe a rozdělí na 2 stejné části, které se zpracovávají paralelně dvěma dekontaminačními metodami.

Jiné materiály, jako například půda, vzorky prostředí, se odebírají rovněž do sterilních nádobek a zpracovávají se obdobně jako patologické materiály, nebo podle specifických postupů.

4.2. Mikroskopický průkaz

Jde o rychlou a jednoduchou metodu při vyhledávání osob s tuberkulózou a při kontrole účinnosti jejich léčby. Při tomto vyšetření chybí možnost bližší identifikace a posouzení jejich životaschopnosti. Mykobakteria ovlivněná terapií mohou být prokázána mikroskopicky, ale nerostou již v kultivacích, jsou biologicky inaktivní. Nález acidorezistentních tyček v preparátu musí být vždy potvrzen kultivačně.

Nejpoužívanější metodou k průkazu acidorezistentních tyček je barvení vzorků. Používá se metoda barvení podle Ziehl-Neelsena, nebo barvení

flourchromy. Obě barvicí metody využívají acidorezistence mykobaktérií a z toho vyplývající schopnosti uchovat si při barvení anilinovými barvami původní zabarvení i po moření preparátu kyselinami nebo louhem. (Homolka J. a Votava V., 2003)

Barvení fluorochromy Auraminem a Rhodaminem s následným vyšetřením fluorescenčním mikroskopem za použití UV záření. Acidorezistentní tyčky se jeví jako zářící žlutozelené až stříbrné tyčky na temně červeném pozadí. Tato metoda je rychlejší, citlivější, ale i dražší. Hodnotí se množství acidorezistentních tyček (ART) v 25 zorných polích.

Hodnocení:

Negativní – ART nenalezeny nebo 1 – 4 ART

+ - 5 – 20 ART

++ - 21 – 100 ART

+++ - více než 100 ART

Barvení podle Ziehl-Neelsena je barvení koncentrovaným kyselým karbolfuchsinem za horka. Preparát se zahřívá nad plamenem (3x do výstupu par). Pozadí se kontrastně dobarvuje malachitovou zelení nebo metylenovou modří. Prohlíží se světelným mikroskopem. Acidorezistentní tyčky jsou červeně zbarvené na zeleném, případně modrém pozadí podle dobarvení malachitovou zelení nebo metylenovou modří. Používá se při mikroskopické kontrole kultur a zejména při hodnocení mikroskopického vzhledu kultur netuberkulózních mykobakterií. (Kubín M. a kol., 1986)

Vyšetřuje se 50 zorných polí v celém preparátu.

Hodnocení:

Negativní – ART nenalezeny

1 – 9 - ojediněle (udává se počet)

+ - 10 – 20 ART

++ - 21 – 100 ART

+++ - více než 100 ART

4.3 Kultivační průkaz

Umožňuje posouzení vlastností izolovaných kmenů, především stanovení jejich druhové příslušnosti a citlivosti na antituberkulotika. Zavedení

kultivačního průkazu usnadňuje diagnostiku iniciálních forem a malých tuberkulózních nálezů, které unikají mikroskopické diagnostice. Dalším přínosem izolačních metod je možnost odlišení obligátně patogenních mykobaktérií jako původců klasické tuberkulózy od podmíněně patogenních druhů jako původců mykobakterióz. Možnosti izolace a udržování mykobaktérií jsou nezbytným předpokladem ke studiu účinku antituberkulotik a metabolismu acidorezistentních mikroorganismů.

Kultivační půdy

Umělá kultivační prostředí umožňují pomnožení mykobaktérií v charakteristických makrokoloniích. Půdy mají současně omezovat pomnožování kontaminující mikroflóry a růst mykobaktérií na nich má být co nejrychlejší.

Pro kultivaci mykobaktérií jsou vhodné Löwensteinova – Jensenova nebo Ogawova půda. Obě půdy jsou vaječné, na jejich přípravu se používají čerstvá vejce s přídavkem škrobu, glycerolu a aminokyselin. Přidává se i malachitová zeleň na potlačení růstu nescifické mikroflóry. Z tekutých půd je nejpoužívanější Šulova půda, která se připravuje z firemně dodávaného koncentrátu. (Kubín M.a kol., 1986)

Dekontaminace

Dlouhá generační doba mykobaktérií proti jiným baktériím způsobuje, že jsou mykobakteria na půdách rychle přerostlá kontaminující bakteriální flórou, jejíž produkty mohou navíc potlačovat v médiu růst mykobakterií. Proto je nutné nejdříve provést dekontaminaci získaného materiálu. Využívá se relativní odolnost mykobaktérií k účinku dekontaminačních činidel.

Dalším účelem moření materiálu je homogenizace vzorků, jednak pomocí mechanického třepání, jednak vlivem dekontaminačních činidel samotných.

Posledním krokem je koncentrace maximálního počtu mykobaktérií do nejmenšího objemu, kterého se dosahuje centrifugací. Prostředky používané k dekontaminaci a následné neutralizaci jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab.2 Přehled metod k zpracování materiálu pro kultivační průkaz mykobaktérií

Dekontaminace		Neutralizace	Centrifugace	Poznámka
prostředek	trvání			
3% laurylsulfát sodný 1% NaOH	30 min.	Okyselená H ₂ O	20 min.	
4% NaOH	30 min.	Promytí H ₂ O	20 min.	Centrifugace vzorku před promytím a znovu po promytí H ₂ O
1 N HCl	20 min.	2 N NaOH	20 min.	
0,3 % Nekal Bx 0,5 % NaOH 0,3 % Na ₃ PO ₄	24 hod.			Očkování spontánně vzniklého precipitátu
2% NaOH 1,5 % citronan sodný 0,5% n – acetyl - cystein	15 min. pH 6,8	Fosfátový pufr	15 min.	
1% cetylpyridinium 2 % NaCl	Během transportu	Zředění H ₂ O	15 min.	

Inokulace

Po dekontaminaci se očkují dvě tekuté a dvě tuhé půdy, které se pak inkubují při 37°C. Vzorky, ve kterých lze očekávat podmíněné patogeny *M. marinum*, nebo *M. chelonae* se paralelně očkují na stejný počet půd a inkubují se při 32°C.

Odčítání a hodnocení kultur

Pomalý růstový cyklus většiny mykobakteriálních druhů vyžaduje k vytvoření viditelných makrokolonií v primokultuře alespoň dva týdny inkubace. Rychleji rostou pouze rychlerostoucí druhy, v primokulturách z materiálu i tyto kmeny vyžadují 7 dní inkubace. Inkubace trvá 9 týdnů.

V rutinní praxi se odčítá materiál poprvé po 3 týdnech inkubace. Vyřadí se kontaminované vzorky a ohlásí se pozitivní nálezy odesílateli. U znečištěných vzorků se vyžádá opakované vyšetření. Další odčítání se provede po 6 týdnech inkubace a odesílají se konečné výsledky, pozitivní i negativní s poznámkou: inkubaci prodlužujeme na 9 týdnů, bude-li výsledek pozitivní sdělíme dodatečně. Po 9 týdnech se oznamují jen pozitivní výsledky a inkubace je ukončena.

Jako negativní na vaječných půdách se hodnotí půdy bez známek růstu na povrchu i v kondenzní vodě. Jako znečištěné se označí půdy pokryté kontaminující flórou, někdy změnou barvy půdy vlivem snížení pH. Jako pozitivní se označí přítomnost kolonií charakteristických pro příslušný mykobakteriální druh.

Na tekutých půdách se jako negativní označují zcela čiré půdy bez zákalu a sedimentu. Znečištěné kultury se vyznačují přítomností netypických, často pigmentovaných kolonií v sedimentu, zákalu nebo blance, které jsou patrné již při prvním odečítání. Pozitivní nálezy se vyznačují charakteristickým růstem u každého druhu mykobaktérií. (Kubín M.a kol., 1986)

Kvantitativní hodnocení pozitivních nálezů u obou typů půd

1 – 9 kolonií	uvádí se přesný počet
+	10 – 19 kolonií
++	20 – 99 kolonií
+++	100 a více kolonií, blanka na tekutině, splývající růst na vaječné půdě

Ověřování pozitivních nálezů

U všech nově zjištěných nálezů mykobaktérií se alespoň v jedné zkumavce ověří růst v mikroskopickém nátěru. Stejně se postupuje také u kontaminovaných kultur. Nátěr může odhalit přítomnost mykobaktérií

neodlišitelných makroskopicky. Při mikroskopickém nálezů acidorezistentních tyček v kontaminované kultuře se získá čistá kultura.

0,2 ml sedimentu z tekuté, nebo dvě kličky z vaječné půdy se přenesou do centrifugační zkumavky, přidá se 5 ml dest. vody a zpracují se stejným způsobem jako vzorek sputa. Stejným způsobem, případně s vynecháním dekontaminace, lze postupovat při inokulaci kultury morčeti.

4.4 Biologický pokus

Biologický pokus ztratil svou dřívější důležitost při průkazu mykobaktérií. Výtěžnost biologického průkazu se snížila především zavedením citlivých izolačních metod. U jiných druhů než *M. tuberculosis* a *M. bovis* nelze biologický průkaz provést vůbec, protože stupeň patogenity je pro morče a jiná pokusná zvířata nízký. Indikací k biologickému pokusu je vyšetření materiálu z mimoplicních tuberkulózních nálezů z neopakovatelně nebo obtížně získaného materiálu. Současně se vždy zakládá kultivace a zhotoví se nátěr pro přímou mikroskopii.

K biologickému průkazu se používají zdravá negravidní morčata o váze 250 – 350 g a stáří 6 – 8 týdnů. Inokuluje se 2 ml nemořenému materiálu nebo sedimentu do inguiny dvou morčat. Kontrola palpací se provádí v místě inokulace každé dva týdny. Při pozitivním nálezů, anebo po 6 týdnech lze pokus ukončit. Při pitvě se hodnotí nález v místě inokulace, regionálních uzlinách, slezině, játrech a plicích. Negativní je normální nález v místě vpichu, jako pozitivní se bere přítomnost granulomu nebo abscesu v místě inokulace, zvětšení jater a sleziny a přítomnost miliárních uzlíků. Nebyl–ly kmen izolován současně kultivačně, provádíme rekultivaci z hnisu nebo abscesu. (Kubín M.a kol., 1986)

4.5 Metody založené na měření metabolických produktů mykobaktérií

Tyto metody patří mezi rychlejší diagnostické postupy jako klasické kultivační metody. Je potřebné je doplnit běžnou mikroskopii a kultivací.

BACTEC systém

Radiometrickou metodou detekuje růst mykobakterií v průběhu 2 týdnů. V kultivačním mediu je přítomna kyselina palmitová značená ¹⁴C, která je za

přítomnosti živých mykobakterií metabolizována na $^{14}\text{CO}_2$. Hodnotí se množství uvolněného radioaktivního $^{14}\text{CO}_2$. Při dosažení určitého růstového indexu se automaticky zaznamenává pozitivní výsledek. Význam metody spočívá zejména ve zrychlení diagnostiky (dává znamení ihned, jakmile se objeví známky množení mikroorganismů) a omezení zbytečné manipulace s infekčním materiálem. Současně šetří čas laboratoře (hemokultury bez známek tvorby CO_2 nemusí být vůbec vyčkovány). (Homolka J. a Votava V., 2003)

Rychlá kultivační metoda MGIT (MGIT-Mycobacteria Growth Indikator Tube supplement)

Kultivační systém, který pro detekci iniciální fáze pomnožování mykobakterií v tekuté půdě, v době, kdy ještě nelze růst makrokolonií vizuálně prokázat, využívá fluorescenční technologii. Fluorescenční látka (Tris -diphenyl-1,10-phenaltriline ruthenium chloride pentahydrate) je v tomto systému vázána silikonem na dně zkumavek s tekutým kultivačním médiem a úbytek kyslíku provázející růst mykobakterií vyvolává fluorescenci, jejíž intenzita je registrována UV transiluminátorem. (Kozáková B.,2006) Pro toto vyšetření jsou vhodné všechny vzorky s výjimkou krve a moči. Paralelně s urychlenou metabolickou metodou zakládáme klasickou kultivaci na půdách a provádíme přímou mikroskopii vzorku.

4.6 Molekulárně genetické techniky

Genetické sondy

Principem je tvorba stabilních hybridů mezi nukleovými kyselinami (RNA nebo DNA) vyšetřovaného vzorku a značenými specifickými DNA nebo RNA sondami. K detekci a identifikaci mykobakterií se většinou používají specifické DNA sondy značené ^{125}J , procento vzniklého hybridu se stanoví gamakamerou.

Polymerázová řetězová reakce PCR (Polymerase Chain Reaction)

Reakce umožňuje pomnožení DNA nebo jejich fragmentů (genová amplifikace). Primery jsou oligonukleotidy se specifickou sekvencí pro *M. tuberculosis*. Příslušná DNA se za pomoci oligonukleotidů pomnoží během 3 hodin na přibližně 160 kopií, které se snadno detekují. Výhodou je stanovení i

z malého množství vzorku. Nevýhoda - k amplifikaci stačí jedině třeba lyzované mykobakterium. (Homolka J. a Votava V., 2003)

Přímý test cílený na *M. tuberculosis* MTB (Myco tb direct)

Provádí se amplifikace specifického úseku RNA s jeho pomnožením. Hybridizace se provádí sondami, které jsou značené akridinem. K hodnocení se používá chemiluminiscence.

DNA fingerprinting

Molekulárně epidemiologická metoda k ověření interpersonální transmise u kontaktů, analýzou délky restrikčních fragmentů. V případě stejných kmenů vykazuje stejné znaky. Pomocí této metody byl zjištěn rozsah interpersonální transmise i mezi HIV infikovanými osobami.

4.7 Nepřímý důkaz mykobaktérií

Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Principem metody je dělení látek iontové povahy podle velikosti disociační konstanty. Umožňuje průkaz charakteristických lipidů.

4.8 Histologický průkaz tuberkulózy

Používá se k průkazu specifické granulační tkáně z biologického materiálu, nejčastěji z lymfatických uzlin, plicní biopsie, nebo jiných mimoplicních ložisek. Barvicím roztokem je karbolfuchsin jako v metodě Ziehl-Neelsen. Histologické vyšetření neodliší tuberkulózu od mykobakteriázy. Bioptické vzorky je třeba zpracovat také kultivačně. (Křepela K., 2007)

4.9 Průkaz sérových protilátek

V imunitní reaktivitě při mykobakteriálních infekcích se vedle projevů buněčné imunity uplatňuje také tvorba sérových protilátek proti různým determinantám mykobakterií. K průkazu sérových protilátek nebo specifických antigenů se využívají monoklonální protilátky.

Imunoenzymatický test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

K vazbě antigenu se používá jako pevná fáze stěna plastových destiček a k průkazu navázaných protilátek konjugát antiglobulinu a peroxidázy, jejich rozklad se měří stupněm intenzity barevného reakčního produktu. Metoda je rychlá a pracuje s minimálními objemy reakčních roztoků i testovaného séra. (Homolka J.a Votava V., 2003)

5 Identifikační metody

5.1 Screening

Cílem screeningových vyšetření je odlišení *M. tuberculosis* a *M. bovis* od podmíněně patogenních a saprofytických mykobaktérií. Je nutné ho provést u všech nově izolovaných kmenů.

Mikroskopická morfolgie se ověřuje alespoň u jedné půdy, ve které byl kmen izolován. Toto vyšetření navazuje na mikroskopické ověřování pozitivních nálezů zjištěných při kultivaci, při které se vyřazují kontaminované kultury. V nátěru se posuzuje tvar a uspořádání tyčinek, přítomnost granul, neacidorezistentních forem apod. Mikroskopie je orientačním vyšetřením, žádný mykobakteriální druh nemá specifické morfologické znaky.

Morfologie makrokolonií se hodnotí v primokulturách i subkulturách na tekutých i vaječných půdách. Na tekuté půdě může jít o růst v sedimentu, zákalu nebo v povrchové drsné hladké nebo mukózní blance. Na pevných půdách zaznamenáváme růst, velikost a povrch kolonií.

Pigmentace se zaznamenává podle zbarvení makrokolonií na tekutých i pevných půdách. Kolonie mohou být nažloutlé, šedé, žluté, oranžové, nepigmentované kolonie se označí jako bezbarvé, průsvitné.

Citlivost na antituberkulotika se určuje u každého nově izolovaného kmene, alespoň u základných preparátů.

Produkce niacinu je považována za základní screeningový test k odlišení *M. tuberculosis* od ostatních mykobakterií. Je založený na tvorbě žlutě zbarvených derivátů, které tvoří kyselina nikotinová s kyanidy za přítomnosti anilinu.

Redukce nitrátu. Enzymatickou reakcí je redukován dusičnan na dusitan, který se prokazuje detekčními činidly jako červená sloučenina. Negativitu testu potvrdí přidání kovového zinku, který dusičnan taky redukuje na dusitan za vzniku červeného zbarvení. Nedojde-li k zbarvení, došlo k postupné redukci na další produkty a reakce se hodnotí jako pozitivní.

Citlivost na hydrazid kys.thiofen – 2 – karbonové (TCH). Růst *M. bovis* je selektivně inhibován 1mg/l TCH. Je spolehlivým testem k odlišení humánních i dalších pomalu rostoucích druhů, které se v přítomnosti TCH pomnožují. (Kubín M.a kol.,1986)

5.2 Identifikace

Cílem identifikace je stanovení druhové příslušnosti zbytku kmenů komplexu *M. tuberculosis*, které nebyly identifikovány při screeningu a identifikace klinicky významných podmíněně patogenních mykobakterií.

Klinická významnost se posuzuje podle:

1. Kmen je izolován u nemocného opakovaně.
2. U nemocného musí být zjištěn relativní patologický proces.
3. Nebyl-li kmen izolován opakovaně, stačí k průkazu patogenity pro nemocného jeho izolace z patologického ložiska.

Izoláty, které nespĺňují podmínky klinické významnosti, se nepodrobují identifikačním testům. K druhové identifikaci byla navržena řada testů *in vitro*, kterými lze v praxi identifikovat většinu klinicky významných izolátů a oddělit je od komenzálních nebo saprofytických mykobakterií.

Identifikační testy

1. Růst při různých teplotách

Čerstvě vyrostlá subkultura v tekuté půdě, nebo suspenze získaná homogenizací jedné kličky kmene z pevné půdy ve fyziologickém roztoku se očkuje na 2 vaječné půdy pro každou z následujících teplot: 22°C, 30°C, 42°C, 45°C, příp.52°C. Odečítá se po 5 dnech inkubace, kdy se hodnotí také rychlost růstu za 4 týdny. Současně se zaznamenává pigmentace a morfologie při optimální teplotě.

2. Niacinový test (Runyon, 1959)

Kys. nikotinová tvoří s kyanidy deriváty, které za přítomnosti anilinu tvoří žlutě zbarvené deriváty.

3. Test fotochromogenity

Fotochemickou reakcí podmíněnou ozářením viditelnou částí slunečního nebo umělého světla a přítomnosti vzduchu dojde k přeměně nebarevných prekurzorů na žlutě až oranžově zbarvené deriváty beta karotenu.

4. Redukce železitých iontů (Szabó a Vandra, 1963)

Enzymatickým štěpením dochází k redukci železitých iontů v médiu a hromadění železa v buňkách mykobakterií, což se projeví červenohnědým zbarvením kolonií.

5. Růst na půdě s 5 % NaCl (Kestle a spol., 1967)

6. Růst na půdě s 0,5 mg / ml hydroxylaminu (HA)

7. Růst na půdě s 0,5 mg / ml p – nitrobenzoátu sodného (PNB) (Wayne a spol., 1976)

8. Růst na půdě s 1 % desoxycholátu sodného (DS) (Saito a spol., 1977)

Testy využívají rezistence některých podmíněně patogenních a saprofytických mykobakterií na testovací sloučeniny.

9. Citlivost na antituberkulotika (AT)

Pro účely identifikace se používá obvykle vyšších koncentrací antituberkulotik. Nízké koncentrace mají z klinického hlediska většinou malou diferenciační hodnotu.

10. Redukce nitrátu (Virtanen, 1960)

Enzymatickou reakcí je redukován dusičnan na dusitan, který se prokáže detekčními činidly jako červená sloučenina.

11. Hydrolýza tweenu 80 (Wayne a spol., 1974)

Enzymatickou hydrolýzou dochází k odštěpení kys. olejové z tweenu 80 (polyoxylethylen sorbitan monooleát) a následná změna pH se projeví zčervenáním indikátoru – neutrální červeně.

12. Průkaz arylsulfatázy (Kubica a Vestal, 1961 modifikováno)

Enzymatickou hydrolýzou je ze substrátu uvolněn fenolftalein, který se prokáže po přidání NaOH červeným zbarvením.

13. Průkaz kyselé fosfatázy (Käppler, 1965)

Enzymatickou hydrolýzou je z fenolftaleinfosfátu uvolněn fenolftalein, který se prokáže po přidání uhličitanu sodného červeným zbarvením.

14. Průkaz beta – galaktosidázy (Kubala, 1970)

Enzymatickým štěpením se ze substrátu uvolní o – nitrofenol, který se projeví žlutým až oranžovým zbarvením.

15. Průkaz glukosidázy (David a Jahan, 1977)

Enzymatickým štěpením se ze substrátu uvolní p – nitrofenol, který se projeví žlutým až oranžovým zbarvením.

16. Průkaz diaminooxidázy (Bönicke, 1966)

Enzymatickým rozkladem dochází k uvolnění amoniaku, který se prokáže Nesslerovým činidlem jako žluté zbarvení.

17. Průkaz acylamidáz (Bönicke, 1960)

Bakteriální suspenze jsou inkubovány v roztocích cyklických amidů. Přítomnost acylamidáz se prokazuje rozkladem příslušného amidu, při kterém se uvolní amoniak, který se prokáže Russelovým fenolhydrochloridovým činidlem.

18. Degradace p – aminosalicylátu (PAS) (Tsukamura, 1961)

Reakční produkty vzniklé enzymatickou degradací PAS zbarvují médium i kolonie šedočerně až černě.

6 Testování citlivosti na antituberkulotika

Zavedením antituberkulotik do léčby se vytvořili i podmínky pro vznik rezistence.

Primární rezistence je definována jako výskyt mykobakteriální populace rezistentní na jednotlivá antituberkulotika u nemocných příslušnými preparáty dříve neléčených. Vzhledem k obtížím spojeným se spolehlivým průkazem okolnosti vzniku primární rezistence se dává přednost obecnějšímu termínu iniciální rezistence.

Sekundární rezistence vzniká jako následek neúspěšné léčby. Pro nemocného má závažné důsledky, protože vyžaduje změnu léčebného režimu a náhradu neúčinného preparátu za účinný podle výsledku testu citlivosti.

Zkřížená rezistence se projevuje u některých preparátů, kterými nebyl nemocný léčen, jako následek podávání jiných léků.

K testování citlivosti se používá několik metod.

Technika absolutních koncentrací pracuje s jedním inokulem, v němž může kolísat počet zárodků $10^2 - 10^8$ /ml, u velkých inokul mohou být citlivé kmeny považovány za rezistentní.

Stanovení podílu rezistentních zárodků – bere se v úvahu nestabilita antituberkulotik v testovacích půdách a výsledek se vyjadřuje jako podíl nejnižší inhibiční koncentrace (MIC) testovaného kmene a MIC indikátorového citlivého kmene, neudává tedy inhibiční koncentrace přímo.

Skličková technika – srovnává růst mykobaktérií v přímých nátěrech, nebo v nátěrech z kultur ponořených v půdách s antituberkulotiky s množением kmene v kontrolním nátěru.

Metoda vertikální vzlínivosti antituberkulotik hodnotí citlivost testovaného kmene naočkovaného na sloupec pevné půdy podle vzdálenosti inhibice od roztoku antituberkulotika na dně zkumavky.

Technika radiometrické respirometrie využívá metabolické inkorporace značeného ^{14}C v kys. palmitové přidané do testovací půdy. Značený ^{14}C se prokazuje v CO_2 , který je uvolňován rostoucími mykobakteriemi, nelze je však detekovat v kulturách inhibovaných antituberkulotiky.

Proporční metoda určování citlivosti se používá k přímému testu při hodnocení citlivosti mykobaktérií přítomných v detekovatelném množství v přímém nátěru z vyšetřovaného materiálu. Používá se také v nepřímém testu, kdy se určuje citlivost kmenů izolovaných v čisté kultuře.

Na testování citlivosti se používají vaječné půdy bez škrobu, ke kterým se přidávají antituberkulotika těsně před koagulací. Testovací kritické koncentrace léků se získávají ředěním základních roztoků. Inokulum se připravuje z primokultury na vaječné půdě po homogenizaci s dest. vodou nebo přímo ze sedimentu v tekuté půdě po homogenizaci. Očkují se 2 kontrolní půdy bez antituberkulotik a dvě půdy s antituberkulotiky. Inkubují se 3 týdny a u pomalu rostoucích kmenů o 1 – 2 týdny déle. Podmínkou ke správnému hodnocení výsledku je pomnožení inokula alespoň na jedné z kontrolních půd v počítatelných koloniích.

Výpočet procenta rezistentních zárodků se provádí podle vzorce:

$$x\% = \frac{a \cdot 100}{b}$$

a – počet kolonií vyrostlých na půdě s kritickou koncentrací antituberkulotika

b – počet kolonií vyrostlých ve stejném ředění na kontrolní půdě.

Jako citlivé kmeny se hodnotí ty, kde podíl rezistentních zárodků vyrostlých v kritické koncentraci antituberkulotika nepřesáhne 1%, a jako rezistentní takové kmeny, kde podíl rezistentních tuto hodnotu převyšuje. Při nedostatečném pomnožení kmene v kontrolních půdách nelze test hodnotit a vyšetření je nutno opakovat za použití nižšího ředění inokula.

7 Terapie

Pod názvem chemoterapie tuberkulózy se rozumí léčení látkami přímo působícími na mykobakteria, která se pomnožují v organismu hostitele. Používají se látky biologického původu - antibiotika, i látky připravené synteticky - chemoterapeutika.

Účinek léčiv se uplatňuje v prostředí hostitele, které v různé míře umožňuje jejich zásah na zárodky v lézích. Tento vztah je dán farmakologickými faktory určenými především farmakokinetikou. Antituberkulotika ve vztahu k organismu hostitele mohou mít negativní účinky. Jsou dány jejich toxicitou, která se projevuje v různých formách lékové nesnášenlivosti.

Rozdělení antituberkulotik podle chemické struktury

Jde logické rozdělení podle chemické příbuznosti látek, předpokládají se jejich podobné vlastnosti a obdobný mechanismus účinku a způsobu biotransformace.

Tab.3 Rozdělení antituberkulotik podle chemické struktury (Trnka a spol.)

Základní skupina	Podskupina	Název léku	Zkratka léku
Sirné sloučeniny	deriváty thiomočoviny	Isoxyl	DAT
	thiokarbazony	Thioacetazon	TB ₁
		Heterocyklický Thiosemikabbazon	HTSC
Karboxylové sloučeniny	aromatické kyseliny s volnou karboxylovou skupinou	p-aminosalicylová kyselina	PAS
	amidy karboxylových kyselin	Pyrazinamid Morfazinamid Ethionamid Prothionamid	PZA MZA ETH PTH
	amidy thiokyselin	Izoniazid	INH
	hydrazidy,hydrazony		
Dusíkaté sloučeniny diaminy	se streptidem s deoxystreptaminem	Ethambutol	EMB
Analogy aminokyselin		Cykloserin Terizidon	CS TZ
Aminoglykosidické aminocyklytoly		Streptomycin Kanamycin	SM KM
Polypeptidy		Viomycin Carpeomycin	VM CM
Ansamyciny		Rifampicin	RMP

Mechanismus účinku antituberkulotik

Reverzibilní nebo ireverzibilní inhibice růstu mykobakterií antituberkulotiky je důsledkem interference s reakcemi nezbytnými pro růst a dělení bakterií. Jsou to například reakce vedoucí k tvorbě proteinů, nukleových kyselin nebo důležitých buněčných struktur. Mykobakteria mají komplikovanou

strukturu a pomalu rostou v kultivačním prostředí, přesto byly získány poznatky, které podporují závěry o primárním zásahu antituberkulotik do životně důležitých biologických pochodů mykobakteriální buňky.

Je zřejmé, že skupiny léčiv, lišící se svým strukturním uspořádáním, mají různé místo primárního zásahu, co má význam při jejich terapeutickém využití v kombinacích.

Tab.4 Mechanismus účinku antituberkulotik

DAT	inhibice syntézy mykolových kyselin
TB ₁ HTSC	zásah do syntézy nukleových kyselin
PAS	zásah do syntézy nukleových kyselin
PZA MZA	zásah do syntézy nikotinamidu
ETH PTH	uvolněná kyselina izonikotinová se zabudovává na místo izonikotinamidu do molekuly koenzymu
INH	zabudování kyseliny izonikotinové do molekuly adeninu za vzniku neúčinného analogu
EMB	inhibice syntézy nukleových kyselin
CS TZ	selektivní inhibice inkorporace D-alaninu
SM KM	inhibice translačních pochodů a chybné čtení kódu mRNA
VM CM	zásah do syntézy bílkovin, pravděpodobně chybné čtení kódu mRNA
RMP	inhibice DNA závislé syntézy RNA, tvorba stabilního komplexu s RNA nukleotidyltransferázou a zábrana vazby enzymu na matriční DNA

Obdobným mechanismem účinku se dá vysvětlit existence zkřížené rezistence mezi některými abtituberkulotiky. Tyto znalosti jsou důležité při volbě antituberkulotik pro opakované léčení tuberculózy. Léky, které mají zkříženou rezistenci, jsou předcházející léčbou kompromitovány, a proto by neměly být nasazeny, dokud není otestována jejich citlivost.

Přítomnost mykobaktérií v extra a intracelulárním prostoru vyžaduje, aby antituberkulotika působila v obou prostředích.

Antituberkulotika pak můžeme dělit podle schopnosti pronikat do intracelulárního prostoru na látky působící výhradně bakteriostaticky extracelulárně, nebo baktericidně intracelulárně.

Z hlediska účinku antituberkulotik jsou důležitá ještě dvě další hlediska. MIC - minimální inhibiční koncentrace, jde o hodnotu udávající nejnižší koncentraci léčiv v objemové jednotce živné půdy, která zabraňuje růstu a množení mykobaktérií.

Druhým hlediskem je určování množství rezistentních mutant v mykobakteriální populaci, která se ve svém celku jeví jako citlivá. Jde zpravidla o průměrnou hodnotu, zjišťovanou u mykobakteriálních kmenů, izolovaných u prokazatelně neléčených nemocných. (Toušek J., 1985)

Na základě těchto zkušeností byly vypracovány léčebné režimy, které obsahují vhodné kombinace antituberkulotik v optimálních dávkách a rytmech a specificky stanovených časových intervalech. Základním požadavkem je vysoká účinnost a nízké riziko toxických projevů. (Bajan A., 1990)

Standardní režimy mají dvě fáze. V průběhu iniciální fáze, která má útočný charakter, se podává denně v období 2 - 4 měsíce v léčebném zařízení trojkombinace antituberkulotik. Cílem útočné léčby je dosažení rychlé redukce původní mykobakteriální populace a zábrana selekce rezistentních mutantů. Pokračovací fáze je druhá zajišťovací fáze. V jejím průběhu se nemocnému podává dvojkombinace antituberkulotik kontinuálně, nebo intermitentně. Cílem této fáze léčby je zabránit množení malého počtu zárodků, které ještě zůstaly v tuberkulózních lézích. Délka této fáze je 9 - 12 měsíců .

Nejllepších výsledků bylo dosaženo použitím INH, RMP, PZA v iniciální fázi a RMP, INH ve fázi pokračovací.

U pacientů s recidivou a chroniků se používají náhradní léčebné režimy. Základním požadavkem je vyšetření citlivosti mykobaktérií na antituberkulotika. Náhradní léčebný režim by měl obsahovat alespoň jeden z nejúčinnějších léků INH nebo RMP, který se v úvodní fázi doplní dalšími dvěma nebo třemi léky.

Pro léčbu mimoplicní formy tuberkulózy se používají stejné terapeutické zásady jako pro plicní tuberkulózu.

Tuberkulózu v graviditě je třeba léčit ihned po jejím zjištění. Dobrý průnik přes placentární bariéru mají INH, RMP, EMB. U těchto léků není prokázán teratogenní účinek na plod. (Bajan A., 1990)

8 Dohled nad tuberkulózou

V současné době je kontrola směřována hlavně na zjištění a nalezení zdroje infekce, přerušení řetězce přenosu infekce.

Znáмым zdrojem infekce je hlavně nemocný člověk vylučující původce tuberkulózy.

U řady nemocných infekční tuberkulózou chybí pro okolí příznaky nemoci, nebo jsou příznaky přisuzovány jinému onemocnění. Je proto nutné tuberkulózu aktivně vyhledávat a počet neznámých zdrojů snížit na minimum.

Mezi screeningové metody patří, rentgenové vyšetření osob se symptomy, které mohou svědčit pro tuberkulózu, jedná se o pasivní vyhledávání.

Aktivnímu vyhledávání se podrobují osoby v kontaktu s tuberkulózou. Provádí se skiagram hrudníku a tuberkulinový test.

Pátrání po tuberkulózních mykobaktériích ve sputu osob, které kašlou a vykašlávají, a to v celé populaci nebo určité skupině, je bakteriologická depistáž. Tento způsob vyhledávání neznámé tuberkulózy je prováděn zejména v rozvojových zemích.

Tuberkulinová depistáž spočívá v provádění tuberkulinových testů, umožňuje rozdělit populaci na část tuberkulózou dosud neinfikovanou a část již infikovanou. Tuberkulinovou reakcí rozumíme viditelné a hmatatelné projevy umělého kožního zánětu, které vzniká v místě, kde byl do kůže dříve již infikovaného nebo vakcinovaného organismu aplikován tuberkulin. Tuberkulin je extrakt získaný z kultury bacilů. (Homolka J. a Votava V., 2003) Diagnostický význam tuberkulinové reakce spočívá při individuálním testování v tom, že je možno se tímto způsobem orientovat o etiologii stávajícího onemocnění.

Zvyšování odolnosti proti tuberkulóze je zajištěna BCG vakcinací. Podkladem vakcinace je umělá nákaza mykobakteriemi se sníženou virulencí, což zajišťuje relativní ochranu proti pozdější infekci virulentními kmeny. BCG vakcinace snižuje riziko závažných komplikací a brání vzniku

závažných forem tuberkulózy – generalizaci hematogenní cestou. Je doporučována zejména pro dětskou populaci, která je k tuberkulóze vysoce vnímavá. (Homolka J. a Votava V., 2003)

Od roku 1981 je dohled nad tuberkulózou v ČR uskutečňován pomocí Národního registru tuberkulózy, který umožňuje hodnocení epidemiologické situace na úrovni regionů a okresů. Hlášení tuberkulózy je základem informačního systému, který eviduje nově zjištěnou tuberkulózu, recidivu onemocnění nebo úmrtí na tuberkulózu. Tento systém umožňuje posoudit účinnost prováděných opatření po stránce diagnostické, terapeutické i preventivní.

Terapie aktivní tuberkulózy je zahajována na lůžkovém zařízení TRN (Tuberkulóza a respirační nemoci), které zajišťuje nejen léčbu, ale i izolaci nemocného. Ambulantní specialisté oboru TRN dokončí terapii, pacient je zde dispenzarizován a sleduje se průběh terapie a její úspěšnost. Vyléčený je pacient, který úspěšně ukončil léčebný režim a je negativní.

(Homolka J. a Votava V., 2003)

9 Závěr

Tuberkulóza zůstává celosvětovým problémem, přestože pokroky v této oblasti jsou významné. 90 % všech případů onemocnění a až 98 % úmrtí se vyskytuje v rozvojových zemích. Současná globalizace světa napomáhá šíření tuberkulózy i do států, kde byla dosud pod kontrolou. Jedním z důvodů je zvyšování počtu onemocnění, které nereagují na standardní léčebné režimy v důsledku nesprávné nebo nedostačující léčby. Nemocní s kmeny rezistentními na 4 až 5 antituberkulotik mají jenom 50 % šanci na přežití, stejně jako před objevem antituberkulotik. Ve světě přibývá ročně 8,5 – 9 miliónu případů. Neustále přibývá lidí koinfikovaných TBC – HIV, ve světě je jich 10,7 miliónů. Z těchto důvodů je mimořádně důležité včasné rozpoznání případů plicní i mimoplicní tuberkulózy. A v našich podmínkách i její zvládnutí na všech úrovních zdravotní péče.

10 Přílohy

Podle údajů získaných z ÚZIS (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR) nastal v minulých letech mírný ústup onemocnění. V tabulce 5 je uveden počet tuberkulózních onemocnění zjištěných v průběhu let 2000 – 2006, údaje zahrnují nově vzniklá onemocnění i recidivy.

Tab. 5 Vývoj počtu onemocnění TBC

ROK	Dýchací ústrojí	Jiná	Celkem	Celkem na 100 000 obyvatel
2000	1244	198	1442	14
2001	1185	165	1350	13,1
2002	1037	163	1200	11,8
2003	1011	151	1162	11,4
2004	909	148	1057	10,4
2005	869	111	1007	9,9
2006	856	117	973	9,4

Hlášená onemocnění nově vzniknutá + recidivy

Tabulka 6 obsahuje počet hlášených onemocnění tuberkulózou u cizinců v průběhu 6ti let. Údaje jsou rozděleny podle země původu nemocného. Podle údajů můžeme sledovat mírný pokles onemocnění. Nejvíce tuberkulózou infikovaných cizinců pochází z Ukrajiny nebo z jiných blíže nespecifikovaných zemí. Použitá data jsou čerpána z databáze ÚZIS.

Tab. 6 Hlášená onemocnění TBC u cizinců podle země narození

Rok	Celkem	SR	Ukrajina	Rumunsko	Vietnam	Ostatní	% hlášení celkem
2000	143	24	41	14	16	48	9,92
2001	193	23	54	11	38	67	14,30
2002	164	20	50	3	35	56	13,67
2003	126	19	21	5	21	60	10,84
2004	149	20	45	3	27	54	14,10
2005	130	16	38	4	21	51	12,91
2006	130	19	40	2	28	41	13,40

11 Zkratky

TBC	Tuberkulóza
HIV	Human Immunodeficiency Virus
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
BCG	Bacillus Calmette Guérin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
<i>M.</i>	Mycobacterium
ART	Acidorezistentní tyčky
MGIT	Mycobacteria Growth Indikator Tube suplement
PCR	Polymerase Chain Reaction
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR

12 Použitá literatura

BAJAN A.: Tuberkulóza, Martin: Osveta, 1990, s.25 – 26, 24 – 56, 162 – 164, ISBN80–217–0078–5

HOMOLKA J., VOTAVA V.: Tuberkulóza, Praha: Karolinum, 2003, s.35, 62 – 66, ISBN80–246–0630–5

KUBÍN M. a kolektiv: Vyšetřovací metody u mykobakteriálních infekcí, Praha: Avicenum 1986, s.21, 27 – 29, 32 – 40, 43 – 51,

TOUŠEK J.:Vývojové trendy v chemoterapii tuberkulózy. Novinky v Medicíně č.33, 1985, Praha: Avicenum s.55 – 63,

VOTAVA M.:Lékařská mikrobiologie speciální, Brno: Neptun, 2003, s.159 - 160, ISBN80 – 902896–6–5

KŘEPELA K.:Tuberkulózy dětí a mladistvých v ČR, Pediatrie pro praxi, 2007, roč.8, č.4, s.209

KOZÁKOVÁ B: Posouzení účinnosti metabolické kultivační rychlometody MGIT(manuální systém) pro záchyt mykobakterií ve srovnání s klasickou kultivační metodou, Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie,2006, roč. 55, č.1, s.37

www.Genex.cz , Molekulární mikrobiologická diagnostika v klinické praxi

www.uzis.cz , Tuberkulóza a respirační nemoci 2006, s.28 – 29

ÚZIS ČR, Tuberkulóza a respirační nemoci 2006, Praha, ÚZIS ČR, 2007, s.28 – 29, ISBN978–80–7280–666–9

