

# Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta

v Hradci Králové

Studijní program: Zdravotnická bioanalýtika

Katedra biologických a lékařských věd



Štěpánka Čejková

## ***Mycobacterium tuberculosis* a jeho diagnostika**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: PharmDr. Barbora Voxová

Hradec Králové, 2016

Škola:	Univerzita Karlova v Praze
Fakulta:	Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra:	Katedra biologických a lékařských věd
Studijní program:	Zdravotnická bioanalytika
Studijní obor:	Zdravotní laborant
Jméno a příjmení autora:	Štěpánka Čejková
Název bakalářské práce:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> a jeho diagnostika
Vedoucí práce:	PharmDr. Barbora Voxová
Rok obhajoby bakalářské práce:	2016

### Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, dne 30. 4. 2016

.....  
Štěpánka Čejková

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucí mé bakalářské práce PharmDr. Barboře Voxové za odborné vedení při jejím sepisování, dále pak MUDr. Janě Svobodové z IFCOOR Brno za mnoho užitečných postřehů z klinické i laboratorní praxe a Mgr. Pavlu Votýpkovi z ÚBLG 2. LF UK a FN Motol za konzultace při sepisování molekulárně genetických metod vyšetření.

## Abstrakt

Striktně aerobní bakterie *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) patří do skupiny *M. tuberculosis* komplex. Jde o původce celosvětově rozšířeného onemocnění – tuberkulózy (TBC), které je hrozbou i ve 21. století a stojí každoročně téměř 1,5 miliónu lidských životů (85). Nejvíce postihuje sociálně slabší skupiny. Zdrojem těchto mykobakterií je téměř vždy nemocný člověk, vzácně také nakažené zvíře. Onemocnění většinou nejprve postihuje dýchací systém a v pozdějších stádiích může napadat jakýkoliv orgán těla. Při imunitní odpovědi organismu na mykobakteria převažuje její buněčný typ a v nepřímé diagnostice je tak využití protilátek velmi problematické. Pro testování buněčné imunitní odpovědi byly v minulosti využívány kožní testy, které jsou dnes nahrazovány tzv. IGRA testy. Na rozdíl od většiny bakterií se u *Mtb* setkáváme s obtížnou diagnostikou. Může za to především dlouhá generační doba, která vede ke zdoluhavé době kultivace. Ke zrychlení je proto využíváno metabolických kultivačních metod.

V přímé diagnostice se stále jako základní uplatňují mikroskopické a kultivační vyšetření, pomoci mohou molekulárně biologické metody. Jednoduché PCR metody umožňují rychlou identifikaci mykobakterií, v přímém průkazu však přináší zvýšené riziko falešně pozitivních výsledků. V epidemiologii se uplatňují molekulárně genetické metody umožňující přesně identifikovat původce nákazy jako je např. fingerprinting. Z nejnovějších metod je vědcům k dispozici metoda sekvenování nové generace (NGS), díky níž se podařilo výrazně snížit cenu i čas potřebný pro osekvenování celého mykobakteriálního genomu. Nové metody sekvenování se dnes výrazně uplatňují ve výzkumu mykobakterií a přinášejí řadu nových poznatků, mimo jiné z oblasti genů zodpovědných za rezistenci mykobakterií k antituberkulotikům.

**Klíčová slova:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* komplex, tuberkulóza, diagnostika, PCR, MTD

## **Abstract**

Strictly aerobic bacteria *Mycobacterium (M.) tuberculosis* (Mtb) belongs to the group of *M. tuberculosis* complex. It is a cause of worldwide spread disease – tuberculosis (TBC), which is being a threat even in the 21st century and claims 1.5 million lives every year (85). It is mainly a threat for socially disadvantaged groups. Source of these mycobacteria is almost always contagious person, rarely contagious animal. The disease almost always first affects respiratory tract, in later stages it can affect any other body organ. The cellular type of immunologic response dominates and so in the indirect diagnostics there is the use of the antibodies being problematic. Skin tests which were used for the testing of the cellular immunologic response in the past are being currently replaced by so-called IGRA tests. In contrast to the most bacteria, *Mtb* diagnostics proves to be difficult. This is caused mainly by the long reproductive time which leads to prolonged cultivation time. To speed up the cultivation metabolic cultivation methods are used.

In the direct diagnostics the microscopic and cultivation techniques still play the main role, help of methods of molecular biology can be used as well. Simple PCR methods enable fast mycobacteria identification, however their use in direct proof brings higher incidence of false positive results. Molecular genetic methods enabling precise identification of source of the infection e.g. fingerprinting are being employed in the epidemiology. Out of the newest methods the next generation sequencing (NGS) method is now available to the scientists. NGS lowered price and time required for the whole mycobacterium genome sequencing. New methods of sequencing are employed in the mycobacterium research and bring new knowledge among others about genes responsible for mycobacterium resistance to antitubercotics.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* complex, tuberculosis, diagnostic, PCR, MTD

## **OBSAH:**

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2. ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE .....</b>	<b>11</b>
<b>3. OBJEV A HISTORIE TUBERKULÓZY .....</b>	<b>12</b>
3.1 Vývoj poznání tuberkulózy .....	12
3.2 Boj s tuberkulózou u nás .....	13
3.2.1 Situace mezi světovými válkami .....	13
3.2.2 Boj s tuberkulózou po roce 1948 .....	14
<b>4. BAKTERIE RODU <i>MYCOBACTERIUM</i> .....</b>	<b>15</b>
4.1 Významní zástupce rodu <i>Mycobacterium</i> .....	15
4.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	16
4.2 Chemické složení mykobakterií .....	16
<b>5. ONEMOCNĚNÍ TUBERKULÓZOU .....</b>	<b>18</b>
5.1 Primární typ tuberkulózy .....	19
5.1.1 Latentní forma tuberkulózy (LTBI) .....	19
5.2 Postprimární typ tuberkulózy .....	19
5.3 Morfologické projevy onemocnění .....	20
5.3.1 Tuberkulózní uzlík .....	20
5.3.2 Tuberkulózní exudát .....	20
5.4 Klinické projevy onemocnění .....	20
5.5 Imunitní odpověď organismu .....	21
5.5.1 Průběh imunitní odpovědi .....	21
<b>6. PREVENCE A LÉČBA TUBERKULÓZY .....</b>	<b>23</b>
6.1 Preventivní opatření .....	23
6.1.1 Očkování .....	24
6.2 Léčba tuberkulózy .....	25
6.2.1 Léčba rezistentních forem TBC .....	25
6.3 Vývoj nových léků .....	26
<b>7. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA MYKOBAKTERIÍ .....</b>	<b>27</b>
7.1 Biologický materiál k záchytu tuberkulózy .....	28

<b>7.2 Příprava vzorku pro diagnostiku.....</b>	<b>28</b>
<b>7.3 Mikroskopický průkaz mykobakterií.....</b>	<b>28</b>
<b>7.4 Kultivace <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....</b>	<b>32</b>
7.4.1 Kultivace na pevných půdách .....	32
7.4.2 Kultivace v tekutých půdách.....	33
7.4.3 Identifikace izolovaných bakterií.....	33
<b>7.5 Metabolické testy.....</b>	<b>34</b>
7.5.1 Průkaz tvorby CO <sub>2</sub> - systém Bactec 460 TB.....	34
7.5.2 Průkaz spotřeby kyslíku - systém Bactec MGIT 960.....	34
7.5.3 Průkaz změny pH – systém MB.....	35
<b>7.6 Vyšetření citlivosti na antituberkulotika.....</b>	<b>36</b>
7.6.1 Proporční metoda testování citlivosti dle Canettiho .....	36
7.6.2 Testování citlivosti v uzavřeném systému typu Bactec .....	37
7.6.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC).....	37
7.6.4 Molekulárně genetické vyšetření rezistence .....	37
<b>7.7 Testování imunitní odpovědi organismu .....</b>	<b>38</b>
7.7.1 QuantiFERON-TB Gold .....	38
<b>7.8 Molekulárně genetická diagnostika .....</b>	<b>39</b>
7.8.1 Izolace nukleových kyselin.....	40
7.8.2 Rychlé amplifikační metody .....	42
7.8.3 Metody bližšího určení mykobakterií .....	47
7.8.4 Kvantifikace genové exprese v imunitních buňkách .....	50
7.8.5 Výzkum genomu mykobakterií.....	51
<b>8. DISKUZE.....</b>	<b>54</b>
<b>9. ZÁVĚR.....</b>	<b>56</b>
<b>10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>57</b>
<b>11. POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE .....</b>	<b>59</b>



# 1. ÚVOD

Zástupci komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (s výjimkou vakcinačního kmene *M. bovis* BCG) jsou původci specifického infekčního onemocnění, tuberkulózy, které v hojně míře přispívá k nemocnosti a úmrtnosti po celém světě. Odhaduje se, že přibližně jedna třetina světové populace je touto bakterií infikována latentně. Z epidemiologického hlediska je tuberkulóza považována za velmi závažné onemocnění a to zejména pro svůj chronický průběh a dlouhodobou léčbu. Především v rozvojových zemích je významnou příčinou šíření nákazy také špatná dostupnost preventivních opatření a léčby. V současnosti se zásadně liší vývoj incidence tuberkulózy v různých částech světa. V rozvinutých zemích nemocnost klesá oproti státům s nízkou životní úrovní, kde je míra morbidity i mortality i nadále značně vysoká. Tuberkulóza je za HIV nejfrekventovanější infekční chorobou světa (1, 2).

Od 40. let 20. století existují proti TBC účinné léky, přesto je tuberkulóza stále velkým veřejným zdravotním problémem, a její výskyt se stále nedaří výrazněji redukovat. Snaha o kontrolu tohoto onemocnění se potýká s obtížemi při diagnostice, prevenci i léčbě. Většina lidí nakažených *Mtb* zůstává asymptomatických. Tento stav se nazývá latentní tuberkulóza (LTBI) a je spojena s celoživotním rizikem vzniku aktivního onemocnění zhruba u 10% nakažených, zatímco 90 % nakažených zůstává nosiči latentní tuberkulózy. V případě oslabení organismu může dojít k aktivaci infekce. V současnosti používanými testy nelze přesně určit, u kterých osob dojde k rozvoji onemocnění. Přitom právě včasná, přesná a rychlá diagnostika je u tohoto závažného onemocnění velmi důležitá (2, 3).

Mykobakteria jsou pro svou stavbu buněčné stěny a dlouhou kultivační dobou nesnadno diagnostikovatelnými bakteriemi. Také imunitní odpověď organismu na přítomnost *Mtb* je složitý proces, který dodnes nebyl zcela objasněn, což brání rozvoji nových diagnostických metod, terapie a vakcinace. Mykobakteria jsou způsobilá intracelulárního přežívání, čímž navozují reakci buněčné imunity s tvorbou žlutavých útvarů tvořených granulomatózní tkání s mohutnými epiteloïdními a Langhansovými buňkami. Extracelulárně jsou schopna přežít v kaseosním materiálu. Všechny tyto skutečnosti přispívají k tomu, že se do praxe jen obtížně zavádějí nové metody prevence, diagnostiky a terapie tohoto onemocnění. K podstatnějšímu urychlení a zpřesnění diagnostiky TBC napomohl rozvoj molekulárně genetických metod (4, 5).

V České republice je výskyt TBC nízký. Situaci, kdy máme TBC pod kontrolou, může ohrozit zhoršení sociální situace některých vrstev obyvatel, příliv imigrantů ze zemí s vysokým výskytem TBC a snížení společenského zájmu o TBC. Pacienti HIV pozitivní jsou vůči TBC mnohem vnímavější než ostatní populace. Zcela nechrání ani očkování. Hlavní zásadou léčby tohoto onemocnění je podávání kombinace antituberkulotik po dobu 4-12 měsíců. Objevují se však kmeny bakterií, které odolávají dosud užívaným lékům. V souvislosti s výskytem multirezistentních kmenů a také se zvýšenou migrací lidské populace, význam kontroly TBC stoupá (6, 7).

## 2. ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE

1. Shrnutí dosavadních poznatků o původci lidské tuberkulózy *Mycobacterium tuberculosis*, jeho historii, prevenci, průběhu onemocnění a léčbě.
2. Zpracování přehledu laboratorních metod používaných k diagnostice *M. tuberculosis* včetně molekulárně genetických metod.

### 3. OBJEV A HISTORIE TUBERKULÓZY

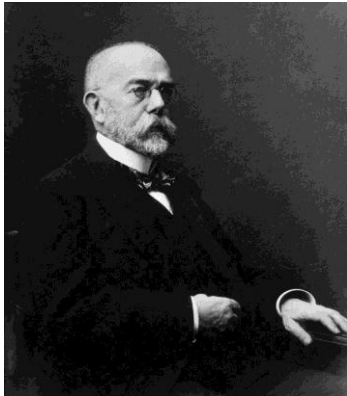
Tuberkulóza původně postihovala stáda sudokopytníků a její přenos na člověka byl především spojen s postupnou domestikací a chovem skotu. *Mycobacterium tuberculosis* se do Evropy a ostatních kontinentů šířilo pravděpodobně z jihu Afriky, kde vzniklo z výchozího *Mycobacterium bovis*, jež se přeneslo přes nilské údolí jako *Mycobacterium africanum* na sever Afriky. V historii na celém světě představovala onemocnění způsobená zástupci komplexu *M. tuberculosis* jednu z nejčastějších příčin předčasného úmrtí. Již na peruánských mumiích a pozůstatcích ze starého Egypta byly objeveny změny po zánětu způsobeném *Mtb*. Nedávné výzkumy dokazují jeho výskyt také na území dnešního Turecka u druhu *Homo erectus*, který zde pobýval před více než půl miliónem let. Tuberkulózní změny byly nalezeny již na kosterních pozůstatcích prehistorických lidí žijících před 8000 lety (8).

#### 3.1 Vývoj poznání tuberkulózy

Vzhledem k výraznému blednutí pacientů, jež bývá průvodním znakem onemocnění (avšak např. v České republice mnohdy tyto příznaky jako bledost, hubnutí, subfebrilie, noční poty, hemoptýza, již zcela chybí), byla tuberkulóza nazývána tzv. bílým morem a její výskyt byl z nedostatku poznání přisuzován božím trestu nebo činům nadpřirozených bytostí. Na východním pobřeží USA dodnes nalézáme doklady o tom, že místní obyvatelé spojovali tuberkulózu s existencí upírů a to až do konce 19. století. Kromě zjevného blednutí pacientů je dalším výrazným symptomem tohoto onemocnění úbytek hmotnosti, díky němuž byla u nás dříve tuberkulóza známá pod názvem souchotiny či úbytě nebo ftíza. Slovo ftíza pochází z řeckého slova *phthisis*, které znamená úbytek. Pojmenování tuberkulóza poprvé do lékařského povědomí zavedl až v roce 1834 německý lékař J. L. Schonlein. Název byl odvozen od typických granulomů-tuberkulů, které se při onemocnění vytváří (4).

Příčinu vzniku granulomů vysvětlil v roce 1882 německý mikrobiolog Robert Koch. Tento držitel Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu z roku 1905 je vyobrazen na obr. 1. a společně s původcem cholery objevil také příčinu tuberkulózy. Svou prací se významně zasloužil o rozvoj lékařské mikrobiologie. Byl u počátků barvení preparátů pro potřeby mikroskopie a u kultivace mikroorganismů na agarových a želatinových půdách. Záslouhou jeho vědeckých objevů se v průběhu 20. století podařilo nejen vysvětlit původ a šíření

nemoci, ale také výrazně redukovat počet jak nakažených, tak nemocných, kteří by v důsledku onemocnění zemřeli (9).



Obr. 1: Objevitel bakterie *Mycobacterium tuberculosis* Robert Koch

## 3.2 Boj s tuberkulózou u nás

První české sanatorium bylo vybudováno v roce 1905 v Žamberku. Bylo zakoupeno Českým pomocným zemským spolkem pro nemocné tuberkulózou a provoz sanatoria byl zahájen v roce 1906 s celkovou kapacitou 47 lůžek. Do roku 1936 zde byly léčeny pouze ženy a děti, později byly rozšířeny kapacity sanatoria a byli zde léčeni také muži. Největší kapacitu zaznamenalo sanatorium v roce 1952, kdy zde bylo k dispozici až 337 lůžek (10).

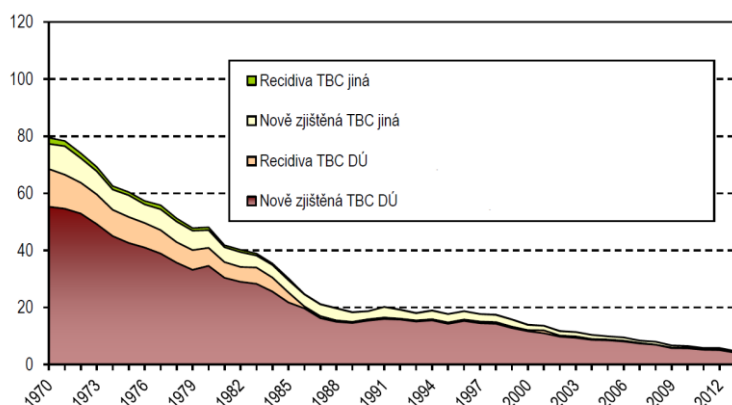
### 3.2.1 Situace mezi světovými válkami

Z epidemiologického hlediska byla na našem území situace kolem tuberkulózy velmi nepříznivá především po první světové válce. V roce 1920 umíralo na toto onemocnění přibližně 35 tisíc obyvatel Československa ročně, tedy 260 na 100 tisíc obyvatel a tento počet byl vzhledem k západoevropským zemím téměř trojnásobný. Nejzávažnější z celého Československa poté byla situace na Slovensku a v Podkarpatské Rusi. Snaha o eliminaci onemocnění v této době narážela nejen na nedostatek finančních prostředků, ale mimo jiné i na nedostatečnou kulturní úroveň postižené oblasti a nedostatek kvalifikovaných lékařů. Na boji s nákazou se v této době nemalou měrou podílela Masarykova liga proti tuberkulóze, která vznikla jako charitativní spolek v roce 1918 (11).

### 3.2.2 Boj s tuberkulózou po roce 1948

V roce 1948 začala být k léčbě používána chemoterapie a na základě zákona č. 61/1948 byla zavedena povinnost hlásit výskyt případů TBC. Mortalitu u dětí se podařilo výrazně snížit povinnou kalmetizací počátkem padesátých let 20. století. Původce tuberkulózy u dobytka, *Mycobacterium bovis*, bylo v Československu eliminováno v roce 1968. Nejefektivnější antituberkulotikum rifampicin bylo do léčby zařazeno v 80. letech. Doba léčby se postupně zkracovala a byla snižována četnost preventivních vyšetření z důvodu radiační zátěže obyvatel. Pro kontrolu nad TBC byl v roce 1981 založen Registr tuberkulózy, jehož nedílnou součástí je databáze Informačního systému bacilární tuberkulózy (ISBT). Registr tuberkulózy shromažďuje data o nově vzniklých případech i recidivách, obsahuje identifikace pacientů, druhy vyšetření, diagnózy, průběh léčby, příslušnost daného pacienta k rizikovým skupinám, absolvovaná očkování apod. Je tak nezbytnou součástí kontrolního systému proti TBC v ČR a umožňuje omezit výskyt tohoto onemocnění (4, 12, 13).

Dnes Česká republika patří do kategorie evropských zemí s nízkou nemocností TBC. V roce 2013 bylo v ČR do Registru tuberkulózy nahlášeno 502 onemocnění tuberkulózou všech forem a lokalizací, tj. 4,8 případu na 100 000 obyvatel. Celosvětově však zůstává nákaza *Mtb* značným problémem, jenž má dosah i na naše území (migrace, multirezistentní formy apod.). Dále tedy pokračuje snaha o snižování jejího výskytu a její morbidity i přes její relativně nízký výskyt (14, 17). Vývoj počtu hlášených onemocnění TBC na našem území je patrný z obr. 2.



Obr. 2: Vývoj počtu hlášených onemocnění TBC na 100 000 obyvatel na našem území (14)

## 4. BAKTERIE RODU *MYCOBACTERIUM*

Z taxonomického hlediska lze rod *Mycobacterium* začlenit do čeledi *Mycobacteriaceae*, řádu *Actinomycetales*, třídy *Actinobacteria*, kmenu *Actinobacteria*. Za taxonomický znak lze označit mykolovou kyselinu, která je pro jednotlivá mykobakteria charakteristická. Bakterie tohoto rodu jsou štíhlé nepohyblivé tyčinky rovného či lehce prohnutého tvaru s oblými konci. Jejich délka se pohybuje mezi 1,5-5 µm a šířka mezi 0,3-0,6 µm. Tyto bakterie nesporulují a netvoří pouzdra (4, 5).

### 4.1 Významní zástupce rodu *Mycobacterium*

Rod *Mycobacterium* zahrnuje celou řadu zástupců, kteří jsou na zemi hojně rozšířeni. Je zde skupina, která se specializovala výhradně na parazitismus v lidském organismu. Mezi ně patří *Mycobacterium leprae*, vyvolávající lepru a skupina bakterií označovaných jako *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Tento komplex zahrnuje fenotypově rozdílné bakterie, které se liší svou patogenitou i způsobem výběru hostitele. Na úrovni genomu si však jsou tyto bakterie velmi blízké a mají z 99,9 % shodnou genetickou informaci. Do tohoto komplexu řadíme bakterie *M. bovis*, jenž se nachází především u dobytka, *M. africanum* typické pro tropické země Afriky, *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canetti* a *M. pinnipedi*. Tato mykobakteria (s výjimkou vakcinačního BCG kmene) jsou schopna vyvolat tuberkulózu. Významnými složkami biotopů jsou podmíněně patogenní druhy mykobakterií, se kterými se v biologickém materiálu, díky přibývajícimu počtu imunosuprimovaných pacientů, setkáváme stále častěji. Mohou u nich vyvolávat tzv. mykobakteriízy s podobnými projevy jako je tomu u tuberkulózy. Na základě patogenity můžeme mykobakteria rozdělit celkem do tří skupin uvedených v tabulce 1 (4, 5, 15, 16).

Tabulka 1: Rozdělení mykobakterií dle patogenity

Obligátně patogenní	Potenciálně patogenní	Nepatogenní (zřídka)
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. gordonae</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. flavescens</i>
<i>M. africanum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. leprae</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. canetti</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. pinnipedi</i>	<i>M. fortuitum</i>	
<i>M. microti</i>	<i>M. chelonae</i>	

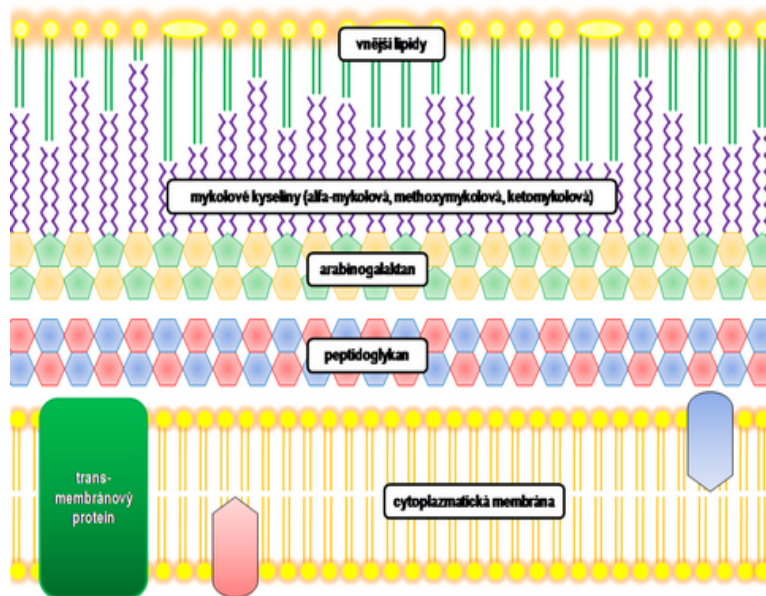
### 4.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Bakterie *Mycobacterium tuberculosis* představuje pro člověka velmi nebezpečného patogena, který závažně ohrožuje jeho zdraví a který je nejčastějším původcem lidské tuberkulózy. Za původce tohoto onemocnění jej označil v roce 1882 Robert Koch, proto se dosud někdy nazývá bacilem Kochovým. Celosvětově vyvolává přibližně 95 % případů TBC (v ČR téměř 100 %). *Mycobacterium tuberculosis* vytváří granulovanou tkáň (granulom) obsahující Langhansovy obří buňky s podkovovitým tvarem jádra. Vysoká hydrofóbnost jeho stěny komplikuje zneškodnění enzymy lysozomů uvnitř makrofágů. Tímto mechanismem způsobuje nebezpečné a protrahované chronické infekce (4, 5).

## 4.2 Chemické složení mykobakterií

Acidorezistentní tyčky (dále již ART) rodu *Mycobacterium* obsahují přibližně 60 % vody, dále organické a anorganické látky (lipidy, proteiny, polysacharidy). Tento rod se vyznačuje specifickým typem buněčné stěny, která je značně odolná k vnějším fyzikálním a chemickým vlivům. Její vlastnost vysoké hydrofobnosti způsobuje množství sloučenin podobných voskům. Významnými složkami buněčné stěny jsou mykolové kyseliny, které se nacházejí pod vrstvou lipidové svrchní části buněčné stěny tvořící vnější obal mykobakterií. U druhu *M. tuberculosis* rozlišujeme tři základní mykolové kyseliny: alfa-, methoxy- a ketomykolovou kyselinu, dále faktor patogenity dimykolát trehalózy, toxický glykolipid a vosk D se senzibilačními účinky vůči endotoxinům a se zvýšeným adjuvantním účinkem. Pod mykolovými kyselinami se nachází polysacharidová vrstva arabinogalaktanu, pod kterou následuje vrstva peptidoglykanu a cytoplazmatická membrána. Zatímco proteinové složky mykobakterií navozují humorální i celulární imunitu (polysacharidy pouze humorální), mykobakteriální lipidy určují toxicitu vůči hostiteli tím, že snižují mykobaktericidní aktivitu alveolárních makrofágů (5, 15). Struktura stěny mykobakterií je znázorněna na obrázku 3.

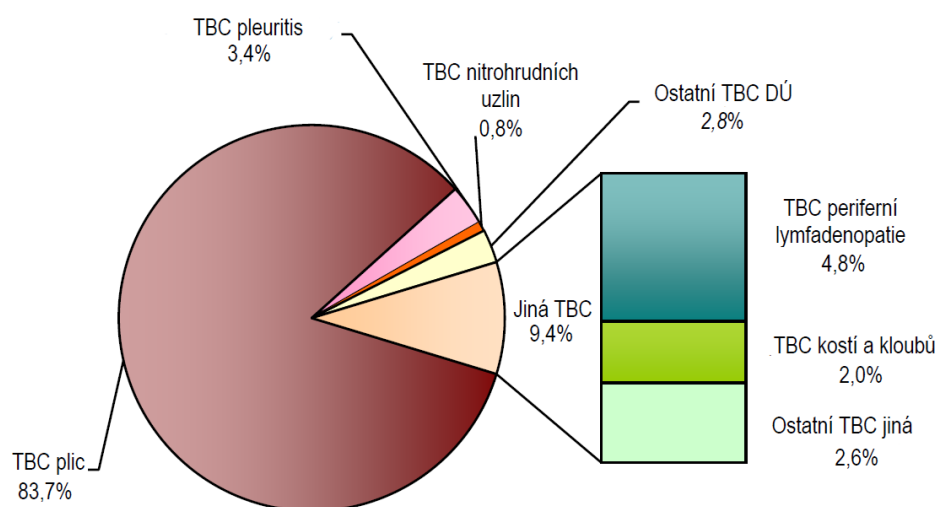




Obr. 3: Schéma morfologie buněčné stěny mykobakteria (19)

## 5. ONEMOCNĚNÍ TUBERKULÓZOU

Tuberkulóza v ČR má nízkou prevalenci. TBC dělíme na primární a postprimární. Primární typ souvisí s prvním kontaktem hostitele a infekcí mykobakteriemi. Postprimární tuberkulóza se rozvíjí u lidí po primoinfekci. Podle statistik napadá *M. tuberculosis* komplex přibližně v 90 % případů dýchací ústrojí. Ve zbylých zhruba 10 % jej nacházíme na jiných orgánech těla. Jde o mízní uzliny, kosti a klouby, urogenitální trakt, kůži, pleny mozkové, peritoneum, perikard a gastrointestinální trakt. Postižen může být prakticky jakýkoliv orgán těla (4, 14). Podrobněji je výčet hlášené TBC dle diagnóz v roce 2013 na obr. 4.



Obr. 4: Struktura hlášené TBC v roce 2013 podle diagnóz (14, převzato a upraveno)

Nákaza vzniká obvykle přímým vdechnutím mykobakterií vylučovaných nemocnými. Dochází k vzniku primárního komplexu (ložisko v plicích a reakce příslušné uzliny). Další rozvoj nemoci závisí na celkové odolnosti jednotlivce, která je u mnoha lidí zvýšena očkováním (BCG) a na genetických faktorech. Může dojít ke zhojení, při kterém se ložisko opouzdří a může kalcifikovat. Mykobakteria však přesto mohou v organismu přežít mnoho let a při poklesu odolnosti vyvolat onemocnění. Při těžké formě se vyvine do nekrózy, která může kaseifikovat a kolikvovat; v nepříznivém stavu tedy pravděpodobně vznikne dutina (kaverna) s dalším šířením infekce a zánětu (4, 20).

## 5.1 Primární typ tuberkulózy

V naprosté většině případů je infekce do dolních plicních laloků přenesena vdechováním kapének bronchiálního sekretu (kapénková forma) volně se vznášejících mikrobů. Množení mykobakterií se v případě primární TBC potlačí rozvinutím buněčné imunity. V průběhu první dekády se změní v tuberkulózní specifický fokus-infekt, jež se vyznačuje centrální nekrózou s okraji z granulační tkáň obsahující epiteloidní, obrovské buňky a lymfocyty. Později zde vzniká kalcifikace. Další rozsev mykobakterií pokračuje přes lymfatické cévy do lokálních mízních uzlin a společně s plicním zánětem utváří primární tuberkulózní komplex. Ve většině případů se s rozvojem buněčné imunity dostaví spontánní zhojení a po 4-6 týdnech bývá ukazatelem pouze přecitlivělost na tuberkulin – tzv. latentní tuberkulózní infekce (LTBI). U progresivní primární tuberkulózy s rozvojem přecitlivělosti primární infiltrát kaseifikuje či mohou vznikat kaverny. Během dalších měsíců se mykobakteria mohou šířit do dalších částí plic, vzácně do ostatních orgánů (4, 9, 21).

### 5.1.1 Latentní forma tuberkulózy (LTBI)

Neaktivní živá mykobakteria, jejichž infekt byl zastaven imunitní reakcí, přežívají bez jakýchkoliv příznaků v organismu. Je možné, že tato forma v průběhu desítek let přejde v aktivní onemocnění. Velmi rizikovou skupinu, u které je pravděpodobný přechod do aktivní formy, představují jedinci HIV pozitivní. Zvýšení rizika nastalo v dnešní době také s nárůstem pacientů po terapii preparáty anti-TNF-alfa, které způsobují útlum imunitní reakce organismu vůči nakažení tuberkulózou. Tento přechod do aktivní formy probíhá asi u 10-15 % jedinců infikovaných latentně. Pacienti s LTBI jsou pravděpodobně pozitivní na IGRA test a tuberkulínovou zkoušku. Jejich radiologické nálezy se vyznačují kalcifikací či zesílením pohrudnice, můžeme však nalézt i normální obraz rentgenu hrudníku (19, 21).

## 5.2 Postprimární typ tuberkulózy

Jedná se o chronickou formu u osob infikovaných řadu let. K jejímu vzniku je zapotřebí další exogenní reinfekce nebo aktivaci primární tuberkulózy. Vzniká klinicky manifestní tuberkulóza po mnohaleté latenci. Reaktivovaná perzistentní mykobakteria potřebují energetický zdroj z mastných kyselin. K jejich tvorbě je nezbytný enzym izocitrátlyáza. Tato mykobakteria pak nacházíme nejčastěji v plicních vrcholech, růstových

zónách dlouhých kostí a v ledvinách. Postprimární tuberkulóza je choroba dospělé populace (4).

### 5.3 Morfologické projevy onemocnění

Z anatomického hlediska spočívá popis patologického obrazu na dvou fenoménech, na charakteristice tuberkulózního uzlíku a tuberkulózního exudátu. Oba se mohou rozvinout do formy kaseózní nekrózy. Tento jev se vyskytuje u primární i postprimární tuberkulózy (4).

#### 5.3.1 Tuberkulózní uzlík

Součástí tuberkulózního uzlíku jsou Langhansovy a epiteloidní buňky. Jeho velikost je okolo 1-2 mm. Obsahuje nejen pro tuberkulózu specifické morfologicky změněné epiteloidní buňky, které jsou přetransformovány v makrofágy fagocytující mykobakteria. Spojením většího počtu těchto makrofágů vznikají velké mnohojaderné Langhansovy buňky. Zhojení tuberkulózního uzlíku může proběhnout tvorbou jizvy či nekrózou tkáně (4).

#### 5.3.2 Tuberkulózní exudát

U jakéhokoliv orgánu, především však u serózních blan a sliznic se můžeme setkat s tvorbou tuberkulózního exudátu. Tuberkulózní exudát je serózní s hojným podílem fibrinu, velkým množstvím makrofágů a lymfocytů. Mění se posléze kaseózní nekrózou a tím se také dostává do okolních oblastí, kde vzniká specifická granulační tkáň obsahující epiteloidní a Langhansovy buňky (4).

### 5.4 Klinické projevy onemocnění

Plicní forma onemocnění může probíhat relativně mírně, u silně oslabených jedinců výjimečně může dojít k mohutnému rozsevu drobných ložisek do celého organismu (miliární TBC) včetně obávaného postižení mozkových plen (bazilární meningitida) nebo k těžkému tuberkulóznímu zápalu plic. Postupné šíření TBC v plicích s četnými rozpady může vést k hemoptýze, k postižení funkce plic a k šíření nákazy do jiných orgánů i na jiné osoby. U většiny nemocných jsou typické projevy onemocnění. Ty mohou být funkční či celostní. Mezi celostní především patří zvýšená únavnost, pocení ve spánku, nižší výkon, nechut' k jídlu,

malnutrice, pokles hmotnosti a v neposlední řadě zvýšená teplota. Do funkčních příznaků lze zařadit především kašel, dušnost, bolest na hrudi a jiné (4, 22).

Mezi fyzikální vyšetření zahrnujeme sledování změn na jizvě po BCG vakcíně, vyšetření zvětšených mízních uzlin a asymetrie hrudníku či jeho znetvoření po torakoplastikách. Hypersonorním poklepem identifikujeme umístění větší kaverny. Sníženou dechovou intenzitu prokážeme poslechem. Provedením RTG skiagrafického vyšetření hrudníku jsme schopni rozeznat ložiskové a infiltrativní stíny. Asymptomatická forma tuberkulózy plic je též často zachycena při RTG vyšetření. Za jistotu v diagnostice tuberkulózy však jen rentgenové vyšetření považovat nelze, a proto je nutná další metoda zajišťující vyšetření sputa. Jeho pozitivitou je poté tuberkulóza prokázána (4, 22).

## 5.5 Imunitní odpověď organismu

Na imunitní odpovědi organismu, a tím i rozvoji tuberkulózní infekce, se podílí řada faktorů. Jedná se o hostitelovu vnímavost, jeho věk a aktuální zdravotní stav, rychlost rozvoje buněčné imunity a také o imunitu získanou (především očkováním). Ze strany patogena je důležitým faktorem infekční dávka, jež je pro člověka u *Mtb* méně než 10 mykobakterií. Přirozenou vnímavost hostitele vůči mykobakteriím ovlivňují genetické faktory, a která úzce souvisí s genem *NRAMP1* (z angl. natural resistance-associated macrophage protein 1) kódujícím přirozenou rezistenci makrofágů. Ve většině případů dojde ke spontánnímu zhojení již díky rozvoji buněčné imunity. Získaná odolnost pak pomáhá zabránit dalšímu rozsevu mykobakterií. Veškeré imunitní mechanismy organismu však nejsou dodnes zcela objasněny (4, 5).

### 5.5.1 Průběh imunitní odpovědi

Jakmile se mykobakteria dostanou do plic a jsou pohlcena alveolárními makrofágy, mělo by dojít k fagocytóze. Ovšem část mykobakterií dokáže potlačit splynutí fagosomů s lysozomy a tím tomuto obrannému mechanismu zabránit. Proto jsou schopna v tomto prostředí přežít a množit se. S rozvojem přirozené odolnosti u infikovaných osob je dalšímu růstu bacilů zabráněno a je podpořeno také vyhojení první infekce (primoinfekce) způsobené infekčním agens čili vytvoření jistého stupně imunity. Jestliže makrofágy nezvládnou růst

bacilů inhibovat a eliminovat je, jsou pro mykobakteria naopak příznivým prostorem k jejich intracelulárnímu růstu. V další fázi je v důsledku pomnožení mykobakterií v cytoplasmě makrofágů způsobena destrukce makrofágů a jejich obsah je i s bacily uvolněn do okolí. Následuje opětovné pohlcení mykobakterií novými makrofágy. Mykobakteriální intracelulární množení pak znemožňuje např. působení inhibičního vlivu vitamínu D a některá mykobakteria jsou usmrcena (4, 5, 9, 22).

Přibližně po měsíci od nákazy se začíná rozvíjet specifická imunitní odpověď v podobě pomocných T-lymfocytů (Th1). T-lymfocyty po rozeznání infikovaných makrofágů začnou uvolňovat interleukiny (IL-2, IL12), interferon gama (INF- $\gamma$ ) a chemokiny. Tyto působky zesílí imunitní reakci aktivací dalších lymfocytů, makrofágů a monocytů, jakož i jejich stimulaci do místa infekce. Zda mykobakterium dokáže intracelulárně růst a pomnožit se, závisí na tom, vyskytují-li se v aktivovaném či neaktivovaném makrofágu. Makrofág se totiž, po transformaci z monocytu a aktivaci, stává mikrobicidním. Makrofágy se též mohou přeměnit ve fagocytující epiteloidní buňky nebo v obří buňky Langansovy (4, 5, 9, 22).

Na specifické imunitní odpovědi se podílejí též cytotoxické T-lymfocyty, jež rozpoznají a svými perforiny a enzymy působí na infektem zasažené fagocyty. Tkáň, jež podléhá nekróze, neposkytuje svým acelulárním prostředím vhodné podmínky pro život mykobakterií a těmito obrannými mechanismy může částečně znemožnit jejich dalšímu rozsevu. Mykobakteria v tuberkulózním ložisku jsou schopna přežít několik desítek let a je tedy pravděpodobná jejich reaktivace. Někdy může nastat likvefakce (zkapalnění) ložiska a vytvoření aerobních podmínek, které mohou vést k podpoře růstu mykobakterií extracelulárně. Tento stav se stává pro imunitní systém nezvladatelným s dalším destruktivním šířením ohniska. Způsobí rozrušení stěny bronchu a tím umožní kapénkový přenos tuberkulózy (4, 5, 9, 22).

## 6. PREVENCE A LÉČBA TUBERKULÓZY

Před více než 100 lety, kdy proti tuberkulóze neexistovala účinná terapie, byla jedinou možností izolace nakažených osob. Skutečný boj s tímto onemocněním začal v roce 1921 v pařížském Pasteurově ústavu. Francouzským lékařem Albertem Calmettem a veterinářem Camilem Guérinem zde byla vyvinuta první očkovací látka proti TBC, která bez nadsázky umožnila v průběhu následujících dekád zachránit miliony lidských životů a která dostala označení BCG (*Bacillus Calmette Guérine*) vakcína. Na další významný úspěch v bitvě s touto zákeřnou chorobou si lidstvo muselo počkat dalších 20 let do chvíle, kdy bylo americkým mikrobiologem Selmanem Waksmanem vyvinuto antibiotikum Streptomycin. Ten se tak stal i přes řadu nežádoucích účinků prvním a velice účinným lékem proti TBC a na jeho úspěch navázaly další léky. V 70. letech 20. století sílil mezi lidmi názor, že se tuberkulózu díky očkování a antibiotikům podařilo prakticky vymýtit. Tento názor byl však mimo jiné vyvrácen zjištěními, že velký rovoj mezinárodního cestovního ruchu vedl k šíření této nákazy i do oblastí, kde se do té doby bylo možné s tímto onemocněním setkat pouze zřídka. Navíc se objevily zcela nové kmeny mykobakterií, které jsou rezistentní na běžně používaná antituberkulotika. Podle odhadů WHO je dnes nakažena *Mtb* až třetina světové populace a rozpočet do roku 2020 pro boj s tuberkulózou v nejchudších částech země se odhaduje na částku 3 miliard amerických dolarů (23).

### 6.1 Preventivní opatření

Mezi důležitou prevencí v boji proti tomuto obávanému onemocnění dnes stále bezesporu řadíme zvyšování životní úrovně obyvatel a upevnění správných hygienických návyků u všech etnických skupin. Dále sem patří vyhledávání a izolace nakažených jedinců a preventivní podávání antituberkulotik. Epidemiologický způsob snižování výskytu tuberkulózy zahrnuje šetření v centru nákazy, vyhledávání kontaktů a léčení nakažených jedinců. V neposlední řadě do kontroly tuberkulózy patří také povinné hlášení TBC, kdy se informuje krajská hygienická stanice. Další opatření, mezi něž se řadí rentgenologické vyšetření plic, se poté používají pouze pro osoby z rizikových skupin (24).

## 6.1.1 Očkování

Jedno z významných a nejvíce diskutovaných preventivních opatření proti tuberkulóze představuje očkování, jehož indikace byla určena především k aktivní imunizaci dětí ve věku od čtyř dní do šesti týdnů, případně starších tuberkulín negativních dětí či dospělých vystavených zvýšenému riziku tuberkulózy. K získání této vakcíny je zapotřebí pasážování z živého původního kmene *Mycobacterium bovis* a jeho postupná atenuace, kterou se dosáhne ztráta virulence a reziduální invazivnosti se zachováním původní protektivní účinnosti (24).

Dne 1. listopadu 2010 bylo vyhláškou č. 299/2010 Sb po téměř 60 letech celoplošné očkování v České republice zrušeno a byla zavedena vakcinace selektivní (54).

### 6.1.1.1 Imunitní reakce na očkování

BCG vakcína se aplikuje intradermálně, po vpichu vznikne v jeho místě zánětlivá reakce. Jakmile mykobakteria osídlí lymfatické uzliny, následuje jejich rozšíření do celého těla. V místě aplikace vakcíny přežívá a pomnožuje se přibližně 10 % zárodků, které chemotakticky přitahují lymfocyty a monocyty z krevního řečiště. Nedochází k tvorbě protilátek, ale zvyšuje se a aktivuje buněčná imunita, která by mohla působit protektivně v případě pozdějšího kontaktu s infekcí. Dendritické buňky sídlící na pomezí organismu s jeho okolím spustí imunitní reakci na periférii, která dále přechází do lymfatických orgánů a graduje v proliferaci naivních lymfocytů. Th1 buněčná odpověď je zárukou kvalitní ochrany očkováných osob, kdežto tvorba Th1 dohromady s Th2 či pouze Th2 ve výsledku představují nezdár, jelikož převažuje-li zrání T-helper buněk v klon Th2, BCG očkování dostatečně nechrání a vede k rozvoji vedlejších účinků. Převaha tvorby Th1 buněčné odpovědi, jejíž vznik závisí z velké části na věku očkované osoby či genetické dispozici a tedy úzce souvisí s důvody, proč očkovat novorozence či velmi malé děti, je také příčinou pro vakcinaci této věkové skupiny (53).



## 6.2 Léčba tuberkulózy

Na úspěch streptomycinu navázala řada dalších preparátů, které se snažily kompenzovat nedostatky prvního antituberkulotika. V současnosti používaná terapie byla vyvinuta již v 60. letech 20. století a je kombinací čtyř druhů antituberkulotik - rifampicinu, pyrizinamidu, isoniazidu a ethambutolu. Tato kombinace se postupem let ukázala jako velmi účinná při dodržení délky terapie 6 až 9 měsíců. V závislosti na rozsahu onemocnění tuberkulózou a přidružených chorobách léčeného pacienta může doba léčby trvat po dobu 4 až 12 měsíců. Vysoká účinnost antituberkulotické terapie vedla v 70. letech k názoru, že byla tato zákeřná nemoc potlačena až vymýcena. Tento názor se však ukázal jako mylný a naopak svět v této oblasti čekala a čeká řada úskalí. Jedním z nich byl vzestup množství HIV pozitivních osob ve společnosti. Osoby nakažené virem HIV jsou díky oslabení imunitního systému 10-15x více náchylnější k propuknutí tuberkulózy. V ojedinělých případech může dojít k nebezpečným interakcím mezi antiviroty a antituberkulotiky, které HIV pozitivní osoby ohrožují na životě a nutí je odložit antivirotickou léčbu až na dobu po vyléčení TBC (4, 23).

### 6.2.1 Léčba rezistentních forem TBC

Výzvou pro vývoj nových léků byl objev mykobakterií, které jsou rezistentní ke standardní terapii. Tyto kmeny vznikají nedodržením léčebných protokolů a podle statistiky WHO je zhruba 5 % nových případů tuberkulózy způsobeno kmenem *Mtb*, který je rezistentní k isoniazidu a rifampicinu. Léčba pacientů nakažených těmito kmeny označovanými jako MDR (z angl. Multidrug-resistant) probíhá až několik let. K léčbě jsou používána antituberkulotika druhé řady a cena terapie je mnohonásobně vyšší, než je tomu u klasických kmenů *Mtb*, což tuto formu léčby naprosto vyřazuje z možnosti využití v chudých částech světa. Skutečnost, že většina nakažených multirezistentními kmeny pochází z chudých oblastí světa, nemotivuje farmaceutické společnosti k výraznému výzkumu nových léčiv. Také proto se odhaduje, že jsou adekvátně léčeny pouze 2 % pacientů nakažených MDR kmeny. Toto procento by v budoucnu mohly zvýšit nové, kratší a efektivnější léčebné postupy v podobě kombinace nejnovějších léků proti MDR - Bedařilinu a Delamanidu (18, 23, 45, 55).

S ještě horší situací se setkáváme u kmenů označovaných jako XDR (z angl. extensively drugresistant). Tyto bakterie jsou rezistentní prakticky ke všem antituberkulotikům 2. řady a podle WHO byly v roce 2008 zaznamenány již ve 49 zemích světa. Odhaduje se, že toto číslo je výrazně sníženo skutečností, že laboratorní vybavenost neumožňuje v mnoha částech světa XDR kmeny vůbec diagnostikovat. Jedním z efektivních nástrojů pro léčbu rezistentních forem tuberkulózy je například lék Linezolid, který se ukázal jako účinný lék proti MDR i XDR kmenům (23, 55).

### 6.3 Vývoj nových léků

Pro vývoj nových léků se jako základní jeví pochopení komplexních vztahů mezi bakterií a organismem. Řada nových léků při svém vývoji selhala totiž právě ve chvíli, kdy testování v laboratoři přešlo na testování na živém organismu. V dnešní době při vývoji nových léků pomáhají také poznatky z výzkumu mykobakteriálního genomu, díky nimž se vědci dozvěděli o několika slabých místech mykobakterií, která by v budoucnu mohla být využita v boji s touto bakterií. Kromě nových metod inhibice syntézy ATP a niacinu také probíhá výzkum sloučenin, jež vedou v bakteriích ke vzniku většího množství oxidu dusnatého, který umožní vypnout buněčné dýchání bakterie a zapříčinit tak její smrt (23).

## 7. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA MYKOBAKTERIÍ

Včasná a správná laboratorní diagnostika tuberkulózy má zásadní vliv na její pozdější léčbu. K získání optimálních laboratorních výsledků je důležitá preanalytická fáze vyšetření, která zahrnuje především správný odběr biologického materiálu, ze kterého má být vyšetření provedeno a také jeho rychlé dopravení do laboratoře při zachování vhodných transportních podmínek. Dnešní laboratorní diagnostika mykobakterií stále využívá klasické metody, kterými jsou mikroskopické vyšetření a kultivace. Kultivace je v posledních letech urychlena využitím automatických kultivačních systémů typu Bactec. V laboratorní diagnostice latentní formy tuberkulózy se uplatňují především tzv. IGRA testy, které umožňují měřit imunitní odpověď organismu na styk s mykobakteriemi (25, 47).

Velký rozvoj v laboratorní diagnostice tuberkulózy přináší molekulárně genetické metody, které jsou stále více využívány při rutinní diagnostice i epidemiologických studiích a umožňují během několika málo hodin prokázat mykobakterie v biologickém materiálu či identifikovat vykultivovaná mykobakteria. Přehled laboratorních metod používaných v diagnostice tuberkulózy je uveden v tabulce 2 (25).

Tabulka 2: Srovnání nejpoužívanějších laboratorních metod k diagnostice *M. tuberculosis* (25)

Laboratorní metoda	Biologický materiál	Doba do získání výsledku	Hodnocení – průkaz
Mikroskopický preparát	všechny materiály moč, krev, menstruační krev, stolice na vyžádání	2 h	acidorezistentní tyčky
Kultivační vyšetření	všechny materiály	2–9 týdnů	živá mykobakteria
Urychlená kultivace BacT/ALERT, Bactec	všechny materiály	několik dnů – 6 týdnů	živá mykobakteria
AMTD, PCR	všechny materiály – u některých testů kromě krve	6–8 hodin	genetický materiál specificky pro <i>M. tbc</i> komplex
QuantiFERON	krev do čtyř speciálních zkumavek	24 h	interferon gama (IFN- $\gamma$ ) stav buněčné imunity

## 7.1 Biologický materiál k záchytu tuberkulózy

Pro záchyt nejčastější, plicní formy TBC, odebíráme ranní sputum. Zpočátku odebíráme vzorek sputa třikrát po sobě do menší plastové nádoby určené k přepravě a v množství alespoň 2 ml. Poté stačí odběr opakovat jednou týdně. Přibližně jednou měsíčně se provádí kontrolní odběr od léčených pacientů. K indukci sputa v případě nemožnosti vykašlání se použije 3% NaCl. Další variantou při nemožnosti získání sputa je laryngální výtěr, který však jako jeho náhrada slouží pouze výjimečně. Dále se provádí odběr bronchiálního výplachu či bronchoalveolární lavážní tekutiny nebo žaludeční aspirát sondou. Protože TBC může mít mnoho podob, provádíme odběry biologického materiálu také u osob s podezřením na její mimoplicní varianty. Podle lokalizace zvolíme odběr některého z těchto materiálů: moč, menstruační krev, likvor, hnis, krev, pleurální výpotek, kloubní výpotek či bioptický, sekční materiál. Veškerý materiál se odebírá do sterilních zkumavek či na sterilní tampony. Vhodnými vzorky pro vyšetření na mykobakteria není stolice a krev (4, 26).

## 7.2 Příprava vzorku pro diagnostiku

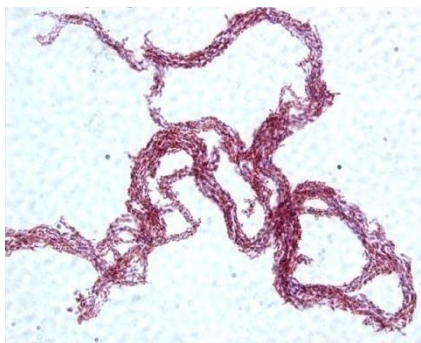
Z důvodu bezpečnosti musí být veškeré laboratorní práce s biologickým materiálem prováděny v biohazard boxu. Před zpracováním většiny druhů došlého materiálu pro kultivační, mikroskopická a amplifikační vyšetření je nezbytné přijaté vzorky podrobit dekontaminaci, homogenizaci a neutralizaci. Dekontaminací se za použití sodného louhu popř. anorganických kyselin potlačí růst průvodní nespecifické mikroflóry. Po dekontaminaci lze sediment použít ke zhotovení nátěru pro mikroskopii, k očkování na kultivační média či použití jeho části jako vstupního materiálu pro amplifikační vyšetření. Bez dekontaminace je možné inokulovat přímo na půdy pouze likvor, punktáty nebo jiné sterilně odebrané vzorky, kde předpokládáme, že budou bez dalších příměsí (26).

## 7.3 Mikroskopický průkaz mykobakterií

Výhodou mikroskopie je její časová nenáročnost, finanční dostupnost a jednoduchost. Výsledek mikroskopie je dostupný obvykle do dvou hodin po zpracování vzorku. Metoda slouží k identifikaci osob s aktivní tuberkulózou a umožňuje přehled kvality jejich léčby. Nemocní s mikroskopickým záchytem acidorezistentních tyčků (ART) se stávají významným

zdrojem infekce a mikroskopie tak může být také důležitým epidemiologickým ukazatelem. Na druhou stranu u tohoto typu vyšetření je nemožné mykobakteria blíže specifikovat a identifikovat jejich vitalitu. Rovněž se jedná o nejméně citlivou metodu, kdy nižší hodnoty ART, než u pacientů s nálezem 50 000-100 000 mykobakterií v 1 ml, není možné tímto vyšetřením podchytit. Pokud není mikroskopický nález potvrzen pozitivní kultivací, jsou acidorezistentní tyčky biologicky inaktivní. Z toho vyplývá, že touto metodou nelze nahradit kultivační vyšetření, pouze jej doplnit. Zjištěné acidorezistentní tyčinky se hodnotí kvantitativně počtem v zorných polích a označí se, dle jejich množství, počtem křížků. Pomocí mikroskopu můžeme pozorovat bakterie izolovaně či ve formě shluků. Typické hadovité útvary, které můžeme vidět v preparátech z kultury virulentních kmenů, nazýváme *cording faktor* (viz obr. 5). Větvící se formy se vyskytují zřídka (26, 27).

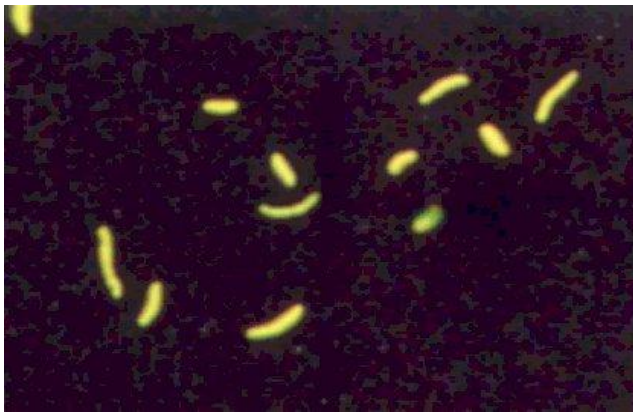
Běžně se při diagnostice používají dva způsoby mikroskopického vyšetření a to fluorescenční mikroskopie využívající barvení fluorochromy a jejich detekci v UV světle nebo mikroskopie ve viditelné části spektra světelným mikroskopem po obarvení dle Ziehl-Neelsena. Oba způsoby barvení využívají acidorezistence mykobakterií (z důvodu velkého množství lipidů v buněčné stěně) a s jejich schopností tvořit stabilní komplexy s barvivy jako fuchsin pro světelnou nebo auramin O pro fluorescenční mikroskopii. Vstřebání barviv umožní např. fenol pro fluorescenční a zvýšená teplota pro světelnou mikroskopii. Následné odbarvování bazemi, zásadami nebo alkoholem není možné, proto se klasické barvení dle Grama nepoužívá. Mikroskopicky se standardně nevyšetřují moč a výtěry (laryngeální a zpravidla ani jiné). Nejčastěji se mikroskopický preparát připravuje z dekontaminovaného vzorku (4, 26, 27).



Obr. 5: *Cording faktor* u virulentních kmenů mykobakterií (28)

### 7.3.1 Fluorescenční metoda

Fluorescenční mikroskopie se využívá k vyšetření majoritního počtu vzorků a přináší oproti barvení dle Ziehla-Neelsena několik výhod. Je senzitivnější a umožňuje odečítání při menším zvětšení (200-400x). Lze tedy prohlédnout větší plochy připadající na jedno zorné pole a tím u každého vzorku menší množství polí. Preparát se hodnotí meandrovitým pohybem v počtu 25 zorných polí, hodnocení se provádí semikvantitativně na křížky (viz tabulka 3). Ke screeningu se používá barvení pomocí fluorochromů (směs auraminu O s rhodaminem B). Pod fluorescenčním mikroskopem se mykobakteria zobrazí jako zářivé stříbřité, žlutozelené tyčinky na tmavě rudém pozadí (viz obr. 6). Jelikož se fluorochromy váží i na některé jiné buněčné struktury, hrozí zde falešná pozitivita, kterou je potřeba vyloučit metodou dle Ziehl-Neelsena a ověřit tak správnost ve světelném mikroskopu (29).



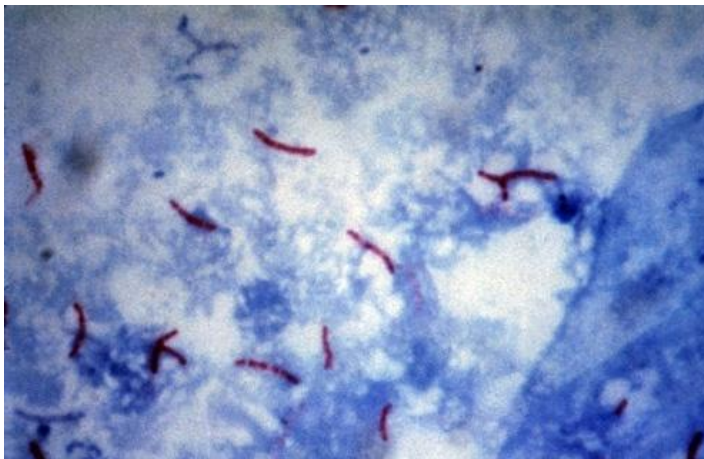
Obr. 6: Obraz *Mtb* po obarvení fluorescenční metodou (30)

Tabulka 3: Hodnocení nálezu mykobakterií po barvení fluorescenční metodou (29)

0	ART nenalezeny (nebo 1 - 4 ve 25 zorných polích)
+	ojedinělé ART (5 - 20 ve 25 zorných polích)
++	početné ART (21 - 100 ve 25 zorných polích)
+++	velmi početné ART (více než 100 ve 25 zorných polích)

### 7.3.2 Metoda dle Ziehl-Neelsena

Ve srovnání s předchozí metodou pomalejší barvicí technika dle Ziehl-Neelsena se využívá především při mikroskopii kultur a jejich kontrole. Připravený preparát se vyšetřuje pomocí binokulárního mikroskopu s použitím imerzního oleje, kde můžeme acidorezistentní tyčky pozorovat jako červeně zbarvené na zeleném či modrém pozadí (obrázek 7). Hodnotí se nejméně 50 zorných polí meandrovitým pohybem ve třech podélných pruzích a pozitivita v preparátu se udává v počtu křížků podle množství nalezených ART (viz tabulka 4) (29).



Obr. 7: Obraz *Mtb* po obarvení metodou dle Ziehl-Neelsena, zvětšeno 1000x (31)

Tabulka 4: Hodnocení nálezu mykobakterií po barvení metodou dle Ziehl-Neelsena (29)

0	ART nenalezeny (v 50 zorných polích)
1 - 9	ojedinělé ART (udává se počet v 50 zorných polích)
+	10 - 20 v 50 zorných polích
++	21 - 100 v 50 zorných polích
+++	více než 100 v 50 zorných polích

## 7.4 Kultivace *Mycobacterium tuberculosis*

Aby nedošlo k narušení kultivace kontaminací přerostlou flórou ostatních bakterií, je potřeba provádět dekontaminace odebraného materiálu. Potlačení růstu *Mtb* mohou způsobit také produkty cizí nesespecifické mikroflory a kultivace by se jimi mohla snadno znehodnotit. Dekontaminaci je možné provádět z důvodu zvýšené rezistence *Mtb* k zásadám a bazím. To je dáno díky značnému obsahu lipidů v buněčné stěně mykobakterií. Zavedené metody, které tohoto využívají, jsou především modifikovaná metoda dle Petroffa nebo metoda s N-acetyl-L-cysteinem (se 4% NaOH + 0,9% citronanu sodného) či postup s laurylsulfátem sodným. Sediment, který vznikne po centrifugaci, se následně očkuje na kultivační media (4, 5, 32).

Objem 0,2 ml vzorku ve formě sedimentu lze očkovat na pevné a tekuté kultivační půdy. Běžně užívanými médii pro kultivaci *M. tuberculosis* jsou Lowensteinova-Jensenova, Ogawova, popřípadě tekuté půdy Šulova a Middlebrook 7H9 či lahvičky automatických systémů. Lahvičky metabolických systémů se očkují a zavádějí do automatického přístroje dle pokynů výrobce z návodu. Po naočkování pevné půdy inokulem, uložíme vzorky ve vertikální poloze do komorového termostatu. Dlouhá generační doba 20-30 hodin, která je vzhledem k ostatním mikrobům (20-30 minut), pro mykobakteria specifická, vyžaduje kultivaci po dobu 9, případně 12 týdnů. Optimální teplota růstu druhu *M. tuberculosis* je 35-37 °C. Odečet se provádí ve 3., 6. a 9. týdnu. U metabolických systémů je doba kultivace daná výrobcem a je možné ji dle potřeby prodloužit (např. u likvoru) (15, 26).

### 7.4.1 Kultivace na pevných půdách

Pro optimální růst mykobakterií jsou půdy speciálně obohaceny o asparagin, glycerol, minerální sole a škrob. Naopak proti růstu nesespecifické mikroflóry se přidává malachitová zeleň. Neodmyslitelnou součástí kultivačních půd jsou také vejce koagulovaná teplem. Nárůst na pevných vaječných půdách Ogawově a Löwenstein-Jensenově je obvykle mezi 3 až 9 týdny. Po jejich naočkování se uloží do termostatu, kde je zajištěna vhodná vlhkost vzduchu a optimální teplota inkubace nejčastěji 37 °C (zřídka nižší) a po 3, 6 a 9 týdnech, někdy po 12 týdnech se provádí odečet. Při záchytu nárůstu pozitivitu hlásíme, následuje mikroskopická kontrola a hodnocení morfologie kolonií. Růst hodnotíme semikvantitativně od ojedinělých kolonií do tří křížků (29, 33).

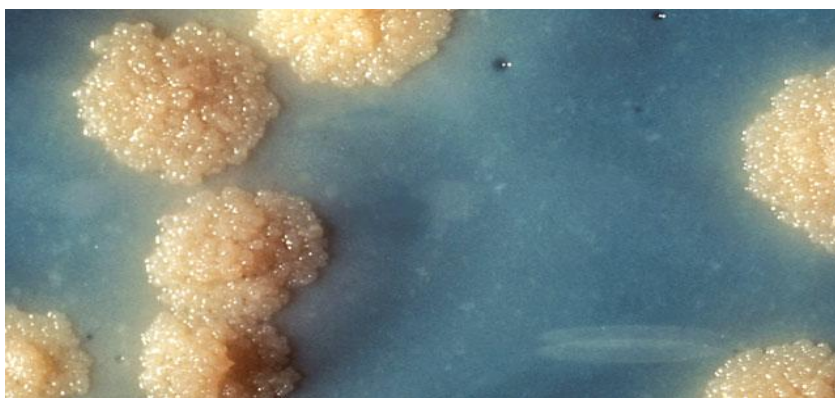


## 7.4.2 Kultivace v tekutých půdách

Mezi standardní média patřila tekutá půda Šulova. Toto komerčně vyráběné medium obsahuje glycerol, biogenní soli, kaseinový hydrolyzát, L-alanin a hovězí sérum (nativní bílkovina). Kolonie se zde objevují obvykle až po 3 týdnech kultivace. Přítomnost mykobakterií se projevuje vločkovitým sedimentem či ve formě drobných zrněk (26, 27).

## 7.4.3 Identifikace izolovaných bakterií

U všech nově izolovaných kmenů jsou pro rozlišení jednotlivých druhů mykobakterií prováděny identifikační metody, které zahrnují sledování mikroskopické morfologie z kultur metodou dle Ziehla-Neelsena, morfologii a pigmentaci kolonií a biochemické parametry. Hodnocení morfologie a pigmentace se provádí na pevných a tekutých půdách, kde se posuzuje velikost kolonií a pigmentace. Tvar a povrch se posuzuje pouze na pevných půdách, kde *Mtb* vytváří květákovitě tvarované kolonie s nepravidelným okrajem, které jsou nažloutlé a drsné, typu R s drolivou konzistencí (obr. 8). Na tekutých se dále hodnotí tvorba zákalu a schopnost růstu v sedimentu. Mezi biochemická měřítka jsou zařazeny tvorba niacinu, redukce nitrátu a testy k diferenciaci *Mycobacterium tuberculosis* a *bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium avium* (26, 29).



Obr. 8: Kolonie *Mycobacterium tuberculosis* (38)

## 7.5 Metabolické testy

Testování metabolických změn, které při kultivaci probíhají ve speciálním uzavřeném kultivačním systému, umožňuje výrazně zkrátit dobu kultivace. V praxi se nejvíce využívá testování spotřeby kyslíku či změny pH kultivačního média při růstu mykobakterií. Kromě samotné detekce je možné v systému také testovat citlivost na některé léky (34, 36).

### 7.5.1 Průkaz tvorby CO<sub>2</sub> - systém Bactec 460 TB

Testovaný vzorek je pomocí sterilní stříkačky inokulován do jedné či více lahvíček obsahujících kultivační mykobakteriální médium s označením 12B. Toto médium je obohaceno základem živné půdy Middlebrook 7H9. Substrátem pro metabolismus mykobakterií je zde kyselina palmitová radioaktivně značená <sup>14</sup>C. V případě pozitivního vzorku je tato mastná kyselina využita mykobakteriemi jako substrát, při jehož metabolismu vzniká <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Ten je uvolňován do atmosféry nad médiem a jeho radioaktivita je kvantitativně měřena na stupnici 0-999. Výsledná hodnota je označována jako index růstu mykobakterií (GI). Pro testování rezistence na léčiva a k odlišení od jiných typů mykobakterií je do kontrolní lahvičky přidáváno inhibiční činidlo, které inhibuje metabolismus a tak snižuje výslednou hodnotu GI. Výsledek testu lze v průměru získat za 9-10 dní. V podobných systémech lze kromě radiometrického stanovení detekovat vznik CO<sub>2</sub> také kolorimetricky (MB/BacT) či fluorescenčně (Bactec 9240 TB) (34, 35).

### 7.5.2 Průkaz spotřeby kyslíku - systém Bactec MGIT 960

Na rozdíl od předchozího testu neprobíhá kultivace v lahvičkách, ale testovaný vzorek je inokulován do zkumavky se 7 ml tekutého média skládající se z modifikovaného Middlebrookova média 7H9 a kasionového peptonu. Na dně každé zkumavky je navázáno 110 μl fluorescenčního indikátoru, který je pomocí silikonové zátky připevněn ke dnu zkumavky. Zkumavky jsou propláchnuty 10% CO<sub>2</sub> a uzavřeny polypropylenovým víčkem. Růst mykobakterií např. jako na obrázku 9 je spojený s úbytkem O<sub>2</sub> a vyvolá fluorescenci. Její intenzita je detekována na UV transiluminátoru (36, 37).



Obr. 9: Růst mykobakterií v přístroji Bactec MGIT 960 (39)

Legenda: Typický vzhled mykobakteriálního růstu v přístroji. Organismy mají sklon tvořit kolonie, jako shluky (šipky) v dolní části zkumavky, podél povrchu fluorescenčního indikátoru.

### 7.5.3 Průkaz změny pH – systém MB

Tato neautomatická metoda je založena na změně pH při růstu mykobakterií v tekutém MB Redox médiu. Testovací zkumavky obsahují 4 ml modifikované tekuté Kirchnerovy půdy, která obsahuje glukózu, koňské sérum, kombinaci vitaminů, kyselinu olejovou, dextrózu, hovězí albumin a katalázu. Navíc je do média přidán redoxní indikátor, kterým je bezbarvá tetrazoliová sůl. Ta je v případě aktivního růstu mykobakterií redukována na barevný formazan. Formazan se akumuluje na povrchu acidorezistentních bakterií a mikrokolonie jsou tak jednoduše detekovatelné jako růžovofialové částice velikosti špendlíkové hlavičky. Pro inhibici růstu ostatních bakterií je do MB Redox média přidávána směs antimikrobních látek, jakými jsou např. polymyxin B, amfotericin B a trimethoprim (40, 41).

## 7.6 Vyšetření citlivosti na antituberkulotika

Citlivost na antituberkulotické léky je jedním z největších problémů, se kterými se lékaři při léčbě tuberkulózy setkávají. Je proto bezpodmínečně nutné u každého nově zjištěného případu tuberkulózní infekce provést testování citlivosti na základní antituberkulotika. Pokud je však zjištěna polyrezistence, je prováděno vyšetření na další léky, především na fluorochinolony. Běžné testování citlivosti se může provádět ze suspenze primokultur z vaječné půdy, jestliže je s dostatečným nárůstem pro přípravu základního ředícího inokula. Toto testování se provádí na pevných vaječných půdách. Jeho výhodou je finanční nenáročnost, naopak nevýhodou je dlouhá doba kultivace. Mezi současné konvenční metody patří proporční metoda dle Canettiho. Do moderních a rychlých metod testování řadíme vyšetření citlivosti v uzavřených automatických systémech typu Bactec či molekulárně genetické vyšetření genů zodpovědných za lékovou rezistenci. Zjištěnou rezistenci je vždy nutné ověřit ještě další metodou (4, 26).

### 7.6.1 Proporční metoda testování citlivosti dle Canettiho

Testování citlivosti mykobakterií podle Canettiho je obvykle prováděno na komerčně dodávaných Löwenstein-Jensenových vaječných půdách, které jsou nality do zkumavek. Nejběžněji je tímto testem zjišťována citlivost na INH, RIF, EMB, PZA a STM. Principem metody je porovnávání mykobakteriálního růstu na půdách, které obsahují tzv. kritické lékové koncentrace s mykobakteriálním růstem na kontrolních půdách, které tento lék neobsahují. Kritickou koncentrací antituberkulotika můžeme definovat jako nejnižší koncentraci, která je schopna inhibovat divoké subpopulace, které se nikdy nedostaly do styku s daným lékem, ale současně tato koncentrace není schopna inhibovat růst mutantních rezistentních subpopulací v izolátech získaných od pacientů, jež nereagují na léčbu. Odečet se provádí po 3-4 týdnech kultivace a výsledek vyšetření se uvádí v tzv. kritických proporcích, která je u rezistentních kmenů 1 %. V případě, že je hodnota menší nebo rovna 1 %, kmen se hodnotí jako citlivý na daný lék. Pokud je však hodnota vyšší než 1 %, kmen je hodnocen jako rezistentní na danou léčbu. Hodnocení testu je založené na tom, že pokud je při testu více než 1 % bakterií odolných vůči léčivu, snižuje to pravděpodobnost účinnosti léčby daným lékem. Pokud na kontrolní půdě vyroste méně než 20 kolonií, nelze výsledek testu považovat za relevantní a test je nutné opakovat (26).

## 7.6.2 Testování citlivosti v uzavřeném systému typu Bactec

Metoda je založena na porovnávání růstu mykobakterií v kultivační zkumavce s antituberkulotikem a v kontrolní zkumavce bez léku. Testování probíhá v uzavřeném systému, kdy jsou detekovány produkty metabolismu vznikající při růstu mykobakterií. Jednotlivé principy detekce jsou popsány výše. Hlavní výhodou této metody je její rychlost. Výsledky vyšetření můžeme získat při použití soupravy BACTEC MGIT 960 SIRE v rozsahu 4-13 dní (42).

## 7.6.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Jedná se o doplňkovou metodu, která se provádí v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Jednotlivé jamky obsahují testované léky nařazené geometrickou řadou. Hodnotíme růst mikrokolonií v přítomnosti léku, který porovnáváme s kontrolou bez léku. Podle jamky s nejnižší koncentrací, ve které ještě došlo k inhibici růstu, se určí minimální inhibiční koncentrace. Výhodou metody je nízká spotřeba Šulovy tekuté půdy a také poměrně krátká inkubační doba, která je přibližně 14 dní (43).

## 7.6.4 Molekulárně genetické vyšetření rezistence

Dodnes bylo v mykobakteriálním genomu popsáno přes 80 genů zodpovědných za rezistenci k různým léčivům. Komerční sety určené pro testování rezistence na molekulární úrovni jsou většinou založeny na PCR amplifikaci dané oblasti DNA s následnou analýzou. V současnosti jsou nejvíce používány kity pro detekci mutací zodpovědných za rezistenci proti RIF a INH. Výsledek molekulárně genetické analýzy rezistence je vždy nutné porovnat s fenotypovým testováním (26, 44).

## 7.7 Testování imunitní odpovědi organismu

Vyšetřovací metody, které testují imunitní odpověď organismu na setkání s mykobakteriemi, označujeme jako metody nepřímé diagnostiky. Největší význam v této oblasti mají tzv. IGRA testy (Interferon Gamma Release Assays), při nichž je měřena hladina interferonu  $\gamma$ , který je produkován specifickými T-lymfocyty po jejich stimulaci tuberkulózními antigeny. Z IGRA testů se u nás uplatňují dva testy - QuantiFERON-TB Gold (Qiagen, USA) a T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, UK). Mezi tyto testy lze zařadit také tuberkulinovou zkoušku MT (Mantoux kožní test), při níž je mikrobiální antigen vpichem aplikován do kůže a je hodnocena imunitní odpověď. MT test není však vhodný pro průkaz LTBI, protože je málo senzitivní (u rizikových pacientů) a nespecifický. V současné době je tato metoda často nahrazována právě testem QuantiFERON (46, 47).

### 7.7.1 QuantiFERON-TB Gold

Serologický test s označením QuantiFERON (Qiagen, USA) hodnotí imunitní odpověď v plně heparinizované krvi. Slouží k diagnostice infekce *Mtb*, jak latentní, tak aktivní formy. Určen je však převážně pro LTBI. Principem testu je použití směsi peptidů, které simulují bílkoviny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4). Tyto bílkoviny nejsou přítomny u žádného kmene BCG a chybí také u většiny netuberkulózních mykobakterií s výjimkou *M.kansasii*, *M.szulgai* a *M.marinum*. Reakcí na tyto peptidy dochází ke stimulaci T-lymfocytů typu Th1, které produkují interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Jeho hladina je poté měřena in-vitro pomocí metody ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (46, 47).

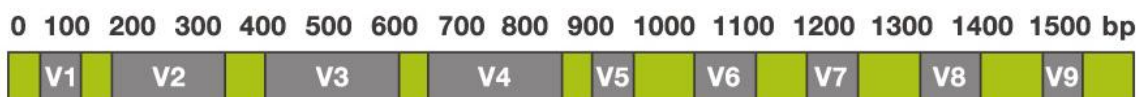
Celý test probíhá ve 3 zkumavkách po dobu 16-24 hodin. Vyšetřovaná krev je odebírána do zkumavek označených NIL (kontrolní zkumavka bez antigenu), TB (zkumavka s lyofilizovanými mykobakteriálními antigeny) a MIT (zkumavka s mitogenem). Všechny zkumavky jsou následně inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 16-24 hodin. Po inkubaci je krev centrifugována a v oddělené plasmě je změřena koncentrace IFN- $\gamma$  (IU/ml). Za relativní nevýhodu se považuje vyšší cena vyšetření. Ovšem celkové náklady jsou nižší především vyšší specifičností oproti MT, jelikož odpadá nutnost RTG a zbytečná profylaktická léčba falešně pozitivních pacientů diagnostikovaných MT. V neposlední řadě je za výhodu testu považován způsob metody *ex vivo* a tedy minimální zatížení pro pacienta. Hodnocení výsledků testu QuantiFERON je znázorněno v tabulce 5 (46, 47).

Tabulka 5: Hodnocení výsledků testu QuantiFERON (47)

Nil (IU/ml)	TB Antigen minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)*	Výsledek QFT	Zpráva/Interpretace
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> NENÍ pravděpodobná
	≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	≥ 0,5	Negativní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> NENÍ pravděpodobná
	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty Nil	Jakýkoliv	Pozitivní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> je pravděpodobná
	< 0,35	< 0,5	Nejednoznačný	Výsledky jsou nejednoznačné na odezvu antigenu TB
	≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	< 0,5	Nejednoznačný	Výsledky jsou nejednoznačné na odezvu antigenu TB
> 8,0	Jakýkoliv	Jakýkoliv	Nejednoznačný	Výsledky jsou nejednoznačné na odezvu antigenu TB

## 7.8 Molekulárně genetická diagnostika

Vývoj v oblasti molekulárně genetických metod dnes umožňuje nejen odlišení mykobakterií od jiných bakteriálních druhů, ale i přesnou identifikaci původce tuberkulózy, včetně jeho kvantifikace. Hlavním přínosem molekulárně genetických metod je jejich rychlost a citlivost, díky níž je pro diagnostiku potřeba minimální množství bakterií a tím i biologického materiálu. Pro rutinní diagnostiku i epidemiologické studie je dnes k dispozici řada molekulárně genetických metod. Pro základní odlišení mykobakterií od ostatních druhů lze použít stanovení sekvence genu kódujícího 16S podjednotku ribosomální RNA. Tato oblast o délce 1542 nukleotidů obsahuje kromě konzervovaných oblastí, které jsou shodné v rámci různých bakteriálních druhů, také oblasti druhově specifické (viz obrázek 10). Právě druhově specifické oblasti jsou při diagnostice cílem pro připojení specifických hybridizačních sond či přímou sekvenací produktů po PCR amplifikaci dané oblasti (48).



Obr. 10: Schematické znázornění genu pro 16S rRNA. Zeleně jsou vyznačeny konzervativní oblasti, šedě oblasti variabilní, neboli druhově specifické (49)

Druhou možností je použít sondy komplementární k úsekům vícekopiových inzerčních sekvencí, které jsou součástí bakteriálního genomu. Přítomnost těchto elementů je způsobena chromozomálními přestavbami během evoluce a skutečnost, že se v chromozomu nacházejí na více lokusech, z nich činí vhodný diagnostický cíl vykazující vysokou citlivost a reprodukovatelnost. V případě bakterií ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex lze využít inzerční sekvenci IS6110 či IS1081. Nevýhodou inzerční sekvence IS6110 je skutečnost, že ji některé kmeny neobsahují. Naopak inzerční sekvence IS1081 se velmi podobá některým inzerčním sekvencím mykobakterií, které do komplexu MTC nepatří a správnost vyšetření tak musí být ověřena sekvenační analýzou. Nevýhodou obou IS je také jejich malá variabilita v rámci jednotlivých kmenů, proto nemohou být použity k jejich typizování. Naopak výhodou je citlivost vyšetření, jelikož využití multikopiové inzerční sekvence umožňuje ve srovnání s běžnými metodami analýzy jednokopiových genů zvýšit senzitivitu vyšetření až 16 x (50, 51).

Další možností molekulárně genetické diagnostiky, která je využívána především pro epidemiologické studie, je využití repetitivních sekvencí, které jsou rozptýleny v genomu mykobakterií. Metody, které se zaměřují na repetitivní sekvence kategorizují počet a velikost opakování těchto sekvencí v jednotlivých lokusech (MIRU-VNTR) nebo jsou založeny na polymorfismu v oblasti přímé repeticity a detekují přítomnost či nepřítomnost nerekpetitivních sekvencí v této oblasti (spoligotypizace). Kromě vyšetření specifických úseků mykobakteriálního genomu je možné využít také celogenomové sekvenování a přečíst tak celý genom bakterie (52, 56).

### 7.8.1 Izolace nukleových kyselin

Většinu molekulárně genetických vyšetření předchází izolace DNA, případně RNA z biologického materiálu. Vhodná izolace nukleových kyselin má zásadní vliv na kvalitu finálních výsledků. K izolaci je dnes možno použít celou řadu komerčních kitů, které jsou určeny pro manuální i automatickou izolaci. V případě izolace chromozomální DNA z bakteriálních buněk, můžeme postup rozdělit do tří základních kroků. V prvním kroku je nutné rozrušit bakteriální buňky a buněčné membrány. Tuto lýzu je možné provést enzymaticky, pomocí detergentů, alkalickou hydrolýzou, osmotickým šokem či mechanicky. Po rozrušení buněk je v druhém kroku potřeba odstranit rušivé složky, kterými jsou proteiny,

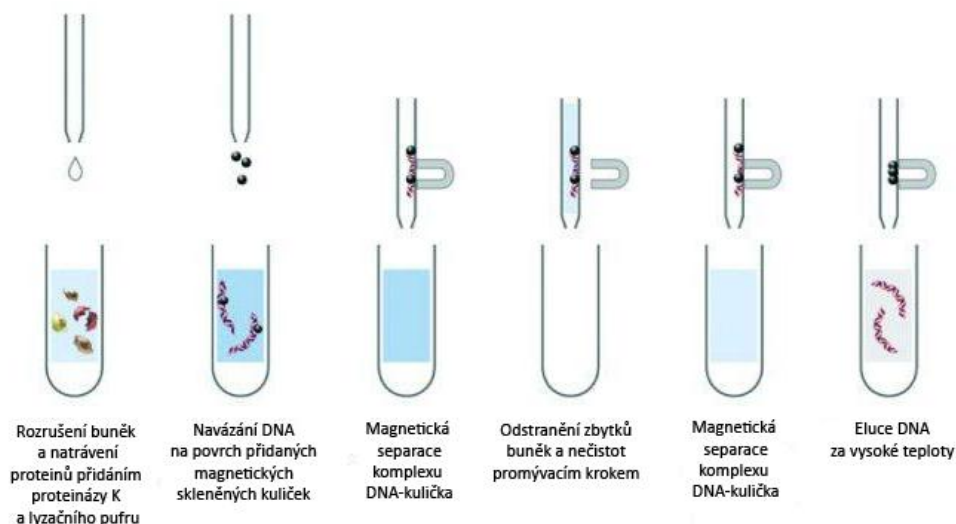


polysacharidy či RNA pomocí precipitace, enzymaticky, gradientovou centrifugací nebo iontoměničovou chromatografií. V dalším kroku je DNA precipitována nejčastěji etanolem či izopropylalkoholem, rozpuštěna ve vhodném pufru a je spektrofotometricky či fluorescenčně měřena její koncentrace a čistota. V případě izolace RNA jsou největším problémem všudypřítomné RNázy, které izolovanou RNA degradují. Všechny roztoky a materiál použitý při izolaci RNA proto musí být RNáz zbaveny (48).

S největším problémem se v praxi setkáváme v případech, kdy je v materiálu jen velmi malé množství bakterií k izolaci. Jedním z těchto případů je i tuberkulózní meningitida, kdy je jako materiál pro izolaci DNA používána cerebrospinální tekutina. V roce 2011 byla v mikrobiologické laboratoři Ústavu lidského chování a spřízněných věd v indickém Dílí provedena studie, která srovnávala výtěžnost čtyř dostupných metod pro izolaci DNA *Mycobacterium tuberculosis* z mozkomíšního moku. Byly použity kity QIAamp DNA purification kit (Qiagen, USA), AMPLICOR<sup>R</sup> respiratory specimen preparation kit (Roche, USA), MagNA Pure LC DNA Isolation Kit (Roche, USA) a kombinace dvou manuálních extrakčních kroků s protokolem automatické DNA extrakce kitem MagNA Pure LC DNA Isolation Kit. Extrahované DNA vzorky byly analyzovány pomocí real-time PCR reakce (57).

Bylo zjištěno, že nejlepší citlivosti dosáhly vzorky extrahované kombinací dvou manuálních kroků extrakce s MagNA Pure kitem, kdy při použití tohoto kitu byl detekční limit pouze 100 kopií *Mtb* v reakci, zatímco u ostatních způsobů izolace DNA bylo zapotřebí 1 000 kopií, tedy 10 krát více. Modifikace izolačního protokolu spočívá v přidání dvou kroků před originální izolační protokol MagNA Pure LC DNA Isolation kit. Následné standardní kroky jsou znázorněny na obrázku 11 (57).

1. Vzorek byl vystaven teplotě 95 °C po dobu 5 minut, následně zmražen při teplotě -80 °C na dobu 5 minut a poté podroben tání.
2. Vzorek se nechal reagovat s 50 µl lysozymu a inkubovat při 37 °C po dobu 30 minut



Obr. 11: Postup izolace DNA kitem MagNA Pure (58, převzato a upraveno)

## 7.8.2 Rychlé amplifikační metody

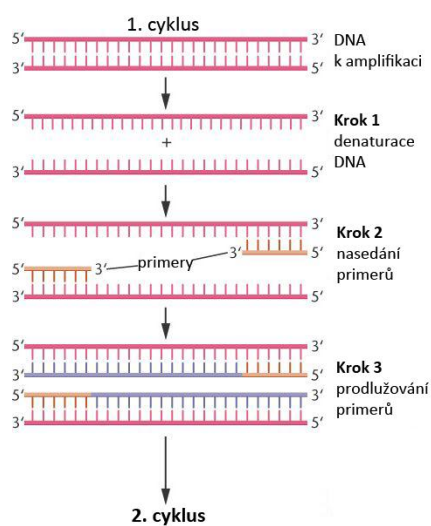
V rutinní molekulárně genetické diagnostice tuberkulózy se dnes v laboratořích velice často setkáváme s metodami rychlé amplifikace specifického úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR, z angl. Polymerase Chain Reaction) či RNA pomocí transkripce zprostředkované amplifikace (TMA, z angl. Transcription-mediated amplification). Tyto metody jsou oblíbené především díky své rychlosti, kdy je možné často získat výsledek za několik málo hodin a také díky své citlivosti. Po namnožení cíleného úseku nukleové kyseliny je vzniklý produkt analyzován a vizualizován. Pro určení přesné sekvence nukleotidů je navíc v potřebných případech možné provést sekvenční analýzu (59).

### 7.8.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda umožňující mnohonásobnou specifickou amplifikaci úseku nukleové kyseliny byla vyvinuta v 80. letech 20. století americkým biochemikem Kerry Mullisem, který za svůj objev obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu v oblasti chemie. Metoda využívá schopnosti DNA polymerázy syntetizovat komplementární vlákno DNA ve směru od 5' konce ke 3' konci. Nejčastěji je využívána Taq polymeráza, která je získávána z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Právě využití enzymu z termofilní bakterie umožňuje, aby enzym nemusel být přidáván na začátku každého cyklu. Reakce probíhá většinou v 18-33 cyklech, které se vždy

skládají ze tří fází – denaturace, annealing, ampliface. Na začátku celé reakce je ještě provedena počáteční denaturace (60).

Při denuraci dochází vlivem teploty k rozpojení vodíkových vazeb mezi jednotlivými vlákny DNA a vznikají dvě vlákna. Při následujícím snížení teploty – annealingu dochází k přisedání primerů ke specifickým oblastem na základě komplementarity. Primery jsou specifické oligonukleotidy o délce 16-20 bází, které jsou komplementární k začátku a konci amplifikovaného úseku, který tak ohraničují. Ve třetí fázi každého cyklu dochází k zabudování jednotlivých deoxyribonukleotidů (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) pomocí polymerázy a vzniká nový komplementární řetězec. Tento postup se cyklicky opakuje, až máme ve výsledku k dispozici několik milionů kopií daného úseku DNA a je zobrazen na obrázku 12 (60).



Obr. 12: Polymerázová řetězová reakce (60, převzato a upraveno)

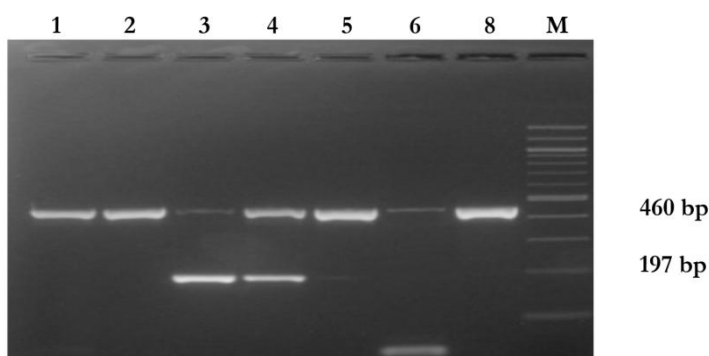
*Mycobacterium tuberculosis* PCR kit od firmy GeneProof pro PCR diagnostiku bakterií patřící do skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex je založen na tzv. jednozkumavkové nested PCR při níž dochází k amplifikaci multikopiové inzerční sekvence ITS6110. Nested PCR je metoda, při níž jsou použity 2 páry primerů. Při první amplifikaci je namnožen větší úsek vyšetřované DNA a pomocí druhého páru primerů je poté amplifikován úsek uvnitř prvního úseku. Jedná se tak o ještě citlivější metodu, než je samotná PCR. Reakce je tak pro každý vzorek prováděna pouze v jedné zkumavce, do níž je napipetováno 36  $\mu$ l PCR master mixu a 4  $\mu$ l DNA. Následná reakce je popsána v tabulce 6. Spolu s vyšetřovanými vzorky je vyšetřována také pozitivní kontrola. Pro kontrolu případné

kontaminace PCR produktem je do mixu přidávána uracil-DNA-glykosyláza (UDG), která je neutralizována těsně před samotnou reakcí. Pro minimalizaci nespecifických reakcí je v mixu použita tzv. „hot start“ polymeráza, tedy enzym, který má reverzibilně blokovanou enzymatickou aktivitu. K odblokování této aktivity dochází až při prvním cyklu PCR reakce (61).

Tabulka 6: Postup jednozkumavkové nested PCR při analýze *M. tuberculosis* (61, převzato a upraveno)

Krok PCR reakce:	Teplota:	Čas:	Počet cyklů:
UDG dekontaminace	37°C	2 min.	
Počáteční denaturace	96°C	10 min.	
Denaturace	96°C	20 sek.	30x
Připojení primerů	70°C	20 sek.	
Extenze	72°C	40 sek.	
Konečná extenze	72°C	30 sek.	
Denaturace	96°C	20 sek.	40x
Připojení primerů	70°C	20 sek.	
Extenze	72°C	40 sek.	
Konečná extenze	72°C	2 min.	

Po reakci jsou vzniklé amplikony analyzovány elektroforézou na 2% agarózovém gelu, obarveny ethidium bromidem a detekovány pomocí UV záření. Ethidium bromid je možné přidat do gelu v průběhu jeho přípravy v koncentraci 5 µl/ml či je možné vytvořit vodní lázeň, v níž jsou gely obarveny. K analýze je použito 10 µl PCR produktu, který je smísen s olejem a napipetován do samostatné jamky v gelu. Spolu s produkty je do samostatné jamky napipetován také ladder (žebříček), který slouží jako ukazatel vzdálenosti, do níž produkty doputovaly. Výsledky analýzy jsou znázorněny na obrázku 13 (61).



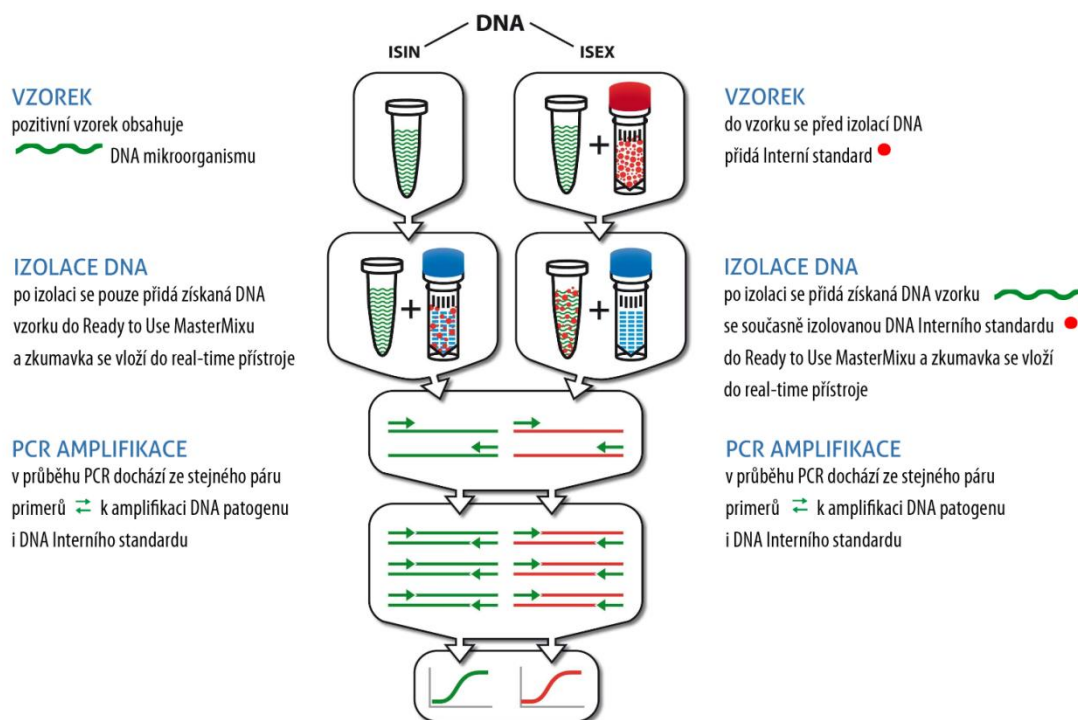
Obr. 13: Výsledek analýzy PCR produktu *M. tuberculosis* (61)

Legenda: Produkt o délce 197 bp detekuje amplifikaci cílené sekvence ITS6110, produkt o délce 460 bp detekuje amplifikaci interního standardu. Vzorky v drahách 1, 2, 5 a 8 jsou negativní, vzorky v drahách 3 a 4 pozitivní na přítomnost *Mycobacterium tuberculosis* ve vzorku a u vzorku v dráze 6 došlo k částečné inhibici vzorku. V dráze M je 100 bp velikostní marker.

### 7.8.2.2 Real-time PCR

Modifikace klasické polymerázové řetězové reakce umožňuje v reálném čase sledovat nárůst fluorescence v každém amplifikačním cyklu. Tento nárůst je přímo úměrný množství vznikajícího PCR produktu. Na rozdíl od klasické PCR, kde pomocí gelové či kapilární elektroforézy většinou hodnotíme přítomnost či nepřítomnost specifického produktu amplifikace, lze tímto postupem získat kvantitativní informaci o vznikajícím produktu. Pro detekci fluorescenčního signálu lze využít několik možností. Nejsnadnější je využití tzv. interkalačních barviv typu SYBR green, EVA green či ethidium bromid, které se v průběhu reakce začleňují mezi vznikající řetězce DNA a dochází ke zvyšování signálu fluorescence. Detekce signálu je však při použití interkalačních barviv nespecifická, proto se časteji setkáváme s použitím fluorescenčních sond, které hybridizují se specifickými jednovláknovými úseky DNA a také s použitím fluorescenčních primerů (62).

*Mycobacterium tuberculosis* real-time PCR kit od firmy GeneProof, pro kvalitativní i kvantitativní detekci bakterií spadajících do skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex i vakcinačních kmenů, umožňuje citlivou analýzu z klinického materiálu pro vyšetření plicní formy – sputum, bronchoalveolární laváž, ale i mimoplicní formy TBC – tkáň, mozkomíšní mok, kostní dřeň, stolice apod. Je založen na metodě real-time polymerázové řetězové reakce (rt-PCR). Podobně jako v případě kitu pro klasickou PCR, dochází i v tomto případě k amplifikaci multikopiové inzerční sekvence IS6110. K měření nárůstu fluorescence v průběhu amplifikace produktu jsou zde využity fluorescenčně značené sondy a přítomnost testovaných bakterií detekována díky zvýšení fluorescenčního signálu barviva FAM. Součástí kitu je také interní standard, jehož amplifikace je detekována barvivem HEX. Interní standard je dodáván ve dvou provedeních a může být kontrolou inhibice PCR reakce (verze ISIN), ale může být také použit při kontrole kvality izolace DNA (verze ISEX). Postup přípravy vzorku k analýze je znázorněn na obrázku 14. Stejně jako v případě mixu pro klasickou PCR, je i zde použita hot-start polymeráza pro omezení nespecifických reakcí a uracil-DNA-glykosyláza (UDG) pro kontrolu kontaminace reakce produkty z předchozí analýzy (63).



Obr. 14: Příprava vzorků a amplifikace kitem *M. tuberculosis* real-time PCR kit od firmy GeneProof (63)

### 7.8.2.3 Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test (AMTD)

Dvoukroková metoda je založena na specifické amplifikaci a detekci mykobakteriální 16S rRNA. V prvním kroku jsou uvolněny nukleové kyseliny z mykobakterií pomocí ultrazvuku. K denuraci nukleových kyselin a rozrušení sekundární struktury rRNA je použita vysoká teplota. Transkripční zprostředkovaná amplifikace při teplotě 42 °C poté specificky amplifikuje cílovou mykobakteriální rRNA transkripční intermediátů DNA. Výsledkem je vznik mnoha kopií amplikonu mykobakteriální RNA. Specifické sekvence jsou v druhém kroku detekovány metodou HPA (Hybridization Protection Assay), při níž dochází ke vzniku komplexu chemiluminiscenčně akridinem značené jednořetězcové DNA sondy a RNA mykobakterie. Stabilní komplex je poté identifikován a měřen v luminometru GeneProbe Leader (64).

#### 7.8.2.4 Porovnání amplifikačních metod s kultivací

Hlavní nevýhodou amplifikačních metod je možnost falešné positivity. Na toto téma byla v roce 2006 na Klinice infekčních nemocí 2. LF UK provedena studie, která se zabývala jak porovnáním citlivosti amplifikačních metod s klasickými kultivačními metodami, ale také právě možností falešné positivity tohoto typu vyšetření. Během studie bylo kultivačně vyšetřeno 647 vzorků. Z tohoto počtu bylo paralelně 275 vzorků podrobena PCR analýze s pozitivním výsledkem u 18 vzorků (6,5 %) a 372 vzorků bylo podrobena AMTD diagnostice s pozitivním výsledkem u 27 vzorků (7 %). Z pozitivních 18 vzorků identifikovaných metodou PCR mykobakterie nebyly vykultivovány v 6 případech (33 %) a z pozitivních 27 vzorků identifikovaných AMTD metodou nebyly mykobakterie vykultivovány u 17 vzorků (62 %). Naopak shodně obě amplifikační metody nedokázaly identifikovat *M. tuberculosis* u 2 vzorků (0,7 % u PCR a 0,5 % u AMPTD), u nichž byla pozitivní kultivace. Výsledky studie jasně ukazují, že je potřeba využívat rychlé amplifikační metody pouze jako doplněk diagnostiky a měly by být vždy prováděny paralelně s mikroskopickým či kultivačním vyšetřením (65).

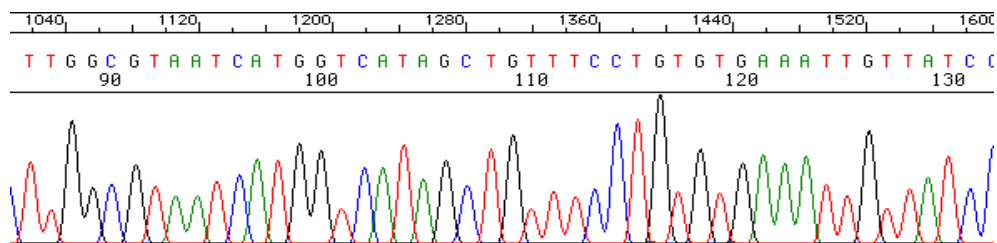
#### 7.8.3 Metody bližšího určení mykobakterií

Metody bližšího určení mykobakterií na základě mutací v jejich genomu se v rutinní diagnostice využívají na rozdíl od rychlých amplifikačních testů jen zřídka. Je to dáno jejich manuální, časovou, ale i finanční náročností. Nezastupitelný význam však mají mimo přesného odlišení jednotlivých mykobakteriálních druhů především v epidemiologii a to například při ověřování interpersonální transmise u tuberkulózních epidemií.

##### 7.8.3.1 Sekvenační analýza

Pomocí sekvenační analýzy je možné rozlišit většinu mykobakteriálních druhů, určit přítomnost specifických sekvencí v genech zodpovědných za rezistenci k antibiotikům či určit původce epidemie. Je to umožněno díky specifickým sekvencím v určité oblasti mykobakteriálního genomu. Klasická metoda sekvenování probíhá na základě Sangerovy metody, kdy jsou do reakce přidávány fluorescenčně značené 2,3 dideoxynukleotidy. Každý typ dideoxynukleotidu je značen jinou fluorescenční barvou, což umožňuje jejich následné rozlišení při detekci laserem po analýze kapilární elektroforézou. Výsledek analýzy

Sangerova sekvenování je znázorněn na obrázku 15. Bakterie jsou po analýze identifikovány na základě shody získaných sekvencí ve FASTA formátu se sekvencemi ve volně i komerčně dostupných databázích (např. [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) (66, 67).



Obr. 15: Výsledek sekvenační analýzy Sangerovou metodou (70)

### 7.8.3.2 Analýza délky restrikčních fragmentů (RFLP) – metoda fingerprint

V důsledku evolučních změn dochází v genomu mykobakterií k mutacím, které vedou ke vzniku genetického polymorfismu a tím ke vzniku či naopak k zániku tzv. restrikčního místa. Restrikční místo je úsek tvořený přesným pořadím několika málo nukleotidů v řetězci, kde dochází ke štěpení fosfodiesterové vazby řetězce DNA specifickou restrikční endonukleázou. Vznikají různě dlouhé fragmenty, které jsou následně analyzovány v agarózovém či akrylamidovém gelu. Poté je DNA metodou Southern blotting přenesena na membránu, na níž dochází k hybridizaci příslušných chemiluminiscenčně značených sond a následně k vizualizaci pomocí radiografie (obrázek 16). Tato metoda slouží často jako nástroj pro zjištění původu a šíření epidemií tuberkulózy v populaci, postupně je však nahrazována celogenomovým sekvenováním metodou NGS (67, 68).

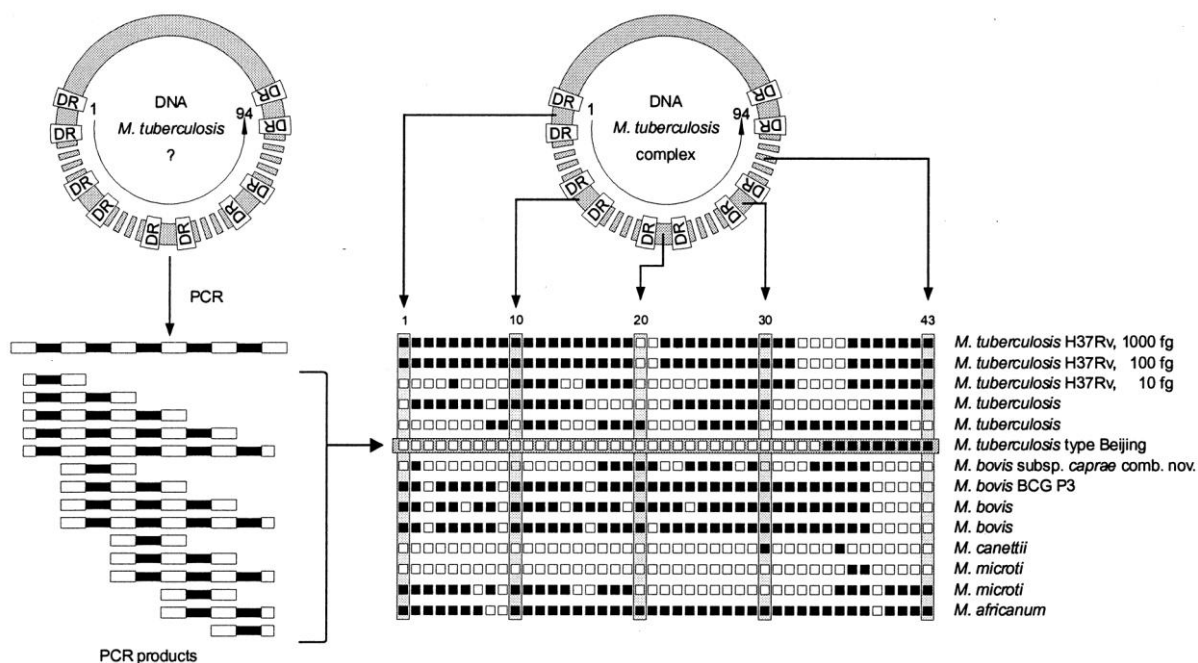


Obr. 16: Výsledek analýzy oblasti IS6110 metodou RFLP (69)



### 7.8.3.3 Spoligotypizace (Spacerová oligonukleotidová typizace)

Tato metoda je založena na genetickém polymorfismu oblasti mykobakteriální DNA, která obsahuje množství tzv. přímých repetitiv (direct repeats, zkráceně DR) o délce 36 bp. Mezi těmito repetitivami se nacházejí tzv. mezerníky (spacers) o délce 35-41 bp. Na základě přítomnosti specifického počtu a umístění těchto spacerů, které jsou důsledkem inserce či delece úseku nukleové kyseliny, je možné identifikovat zástupce bakteriálního komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. Metoda spoligotypizace je prováděna na nylonové membráně se 43 navázanými sondami komplementárními k jednotlivým spacerům. Na začátku je DNA namnožena pomocí multiplexní PCR s primery značenými biotinem. Po reakci je DNA denaturována na jednořetězce a hybridizována se sondami na nylonové membráně. V případě komplementarity jsou produkty chemiluminiscenční reakce vizualizovány autoradiograficky a záznam může být podroben softwarové analýze. Přítomnost jednotlivých skvrn na výsledném záznamu je důkazem přítomnosti daného spaceru v genomu bakterie a jejich kombinace umožňuje její přiřazení k danému kmeni. Schematicky je celý proces znázorněn na obrázku 17 (71).



Obr. 17: Postup spacerové oligonukleotidové typizace (72)

### 7.8.3.4 MIRU-VNSTR

V genomu *M. tuberculosis* se nachází 41 tzv. MIRU (z angl. Mycobacterial Interspersed Repeated Units) lokusů, což jsou 40-100 bp dlouhé repetitivní úseky DNA rozptýlené po celém genomu mykobakterií. Metoda MIRU-VNTR umožňuje charakterizovat počet a velikost těchto repetitivních jednotek ve 12 nezávislých lokusech (obrázek 18). Metoda je založena na diskriminační analýze, při které je provedeno 12 PCR reakcí s následnou analýzou na agarózovém gelu. Díky své snadné proveditelnosti, nízké finanční náročnosti a také možnosti interpretace výsledků v binární kód, což velmi usnadňuje mezilaboratorní spolupráci a sdílení výsledků, se MIRU-VNTR stala referenční metodou pro epidemiologickou diagnostiku tuberkulózy (67, 73, 74).

MIRU alias	Locus name	Location on H37RV genome	Expected length in H37RV	No. of repeat and size repeat	Size of repeat (bp)
MIRU 02	H37RV0154-53 bp	154111	508	2 (53)	
MIRU 04	H37RV0580-77 bp	580546	353	3(77)	
MIRU 10	H37RV0959-53 bp	959868	643	3(53)	
MIRU16	H37RV1644-53 bp	1644026	671	2(53)	
MIRU20	H37RV2059-77 bp	2059429	591	2(77)	
MIRU23	H37RV2531-53 bp	2531560	873	6(53)	
MIRU24	H37RV2387-54 bp	2684427	447	1(52)	
MIRU26	H37RV2996-51 bp	2996002	614	3(51)	
MIRU27	H37RV3006-53 bp	3006875	657	3(53)	
MIRU31	H37RV3192-53 bp	3192168	651	3(53)	
MIRU39	H37RV4348-53 bp	4348401	646	2(53)	
MIRU40	H37RV0802-54 bp	802194	408	1(54)	

Obr. 18: Dvanáct lokusů v genomu *M. tuberculosis* vyšetřované metodou MIRU-VNTR (75)

### 7.8.4 Kvantifikace genové exprese v imunitních buňkách

Snahy o včasnou diagnostiku latentní tuberkulózy vedou k vývoji metod, které by rychle, účinně a spolehlivě odhalovaly pacienty ve vysokém riziku vypuknutí aktivní formy tuberkulózy. V současné době je jediným rutinně stanovovaným markerem v diagnostice imunitní odpovědi organismu INF-gama. Takzvané IGRA testy (z angl. Interferon gamma release assay) zjišťují počet T-lymfocytů secernujících interferon gama či množství produkovaného interferonu senzibilizovanými krvinkami v reakci na stimulaci specifickými *Mtb* antigeny. Mezi omezení spojená s tímto testem patří i požadavek na vzorky krve, které musí obsahovat životaschopné leukocyty. To omezuje použití IGRA testu především u

imunokompromitovaných jedinců (např. HIV poz.), kteří jsou však jednou z hlavních rizikových skupin pro TBC. Z tohoto důvodu existuje značná poptávka po rozvoji více specifických a citlivých metod pro detekci LTBI než jsou kožní či IGRA testy (76).

Pro využití preventivní chemoterapie je však zapotřebí více charakterizovat imunitní status těchto jedinců. Při studii v roce 2010 bylo pomocí kvantitativní PCR (qPCR) testována genová exprese 14 genů jako imunitní odpověď na setkání se specifickým antigenem. Specifická hladina mRNA genů krevních buněk byla testována u pacientů s latentní i aktivní formou TBC, stejně jako u zdravých pacientů. U 6 testovaných genů (*IL10*, *IL2*, *TNF*, *IFI35*, *FOXP3*, a *IFNG*) byly zjištěny specifické hladiny mRNA, které dokáží odlišit pacienty s latentní či aktivní formou tuberkulózy od zdravých jedinců. Mimo to bylo při studii odvozeno 86 specifických genově-expresivních znaků pro TBC, které umožňují odlišení aktivní TBC od jiných zánětlivých a infekčních onemocnění (77).

### 7.8.5 Výzkum genomu mykobakterií

Za velký milník v oblasti výzkumu tuberkulózy můžeme považovat rok 1998, kdy byl kompletně osekvenován genom bakterie *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Tato skutečnost s sebou přinesla celou řadu nových informací. Především to, že se vědci do té doby zaměřovali pouze zhruba na třetinu enzymů a chemických reakcí, které jsou pro život této bakterie v lidském těle potřeba. Bylo prokázáno, že velká část z téměř 4 tisíc genů kóduje proteiny, které se podílí na metabolismu lipidů. Na rozdíl od dosavadních představ, kdy je bakterie popisována jako obligátně aerobní, bylo zjištěno, že bakterie je velmi dobře vybavena také pro život v prostředí, ve kterém se kyslík nenachází. V těchto anaerobních podmínkách dochází ke zpomalení metabolismu bakterie a ta se tak stává necitlivou k podávaným antibiotikům. Právě snaha o ovlivnění metabolických pochodů, které v těchto podmínkách zůstávají aktivní, je jednou z nejslibnějších cest, jak zkrátit celkovou dobu léčby tuberkulózy. Aplikace informací získaných z genomického výzkumu *Mtb* je zcela jistě metodou, která ve svém důsledku může vést k záchraně řady lidských životů (78, 79).

### 7.8.5.1 Celogenomové sekvenování

Ještě v nedávné době bylo vyšetření bakteriálních genomů nákladnou a časově náročnou záležitostí. Ovšem díky rozšiřování nových a levnějších metod analýzy na principu masivního paralelního sekvenování se celogenomová analýza mykobakterií stala mnohem dostupnější. Na rozdíl od klasického Sangerova sekvenování, kdy je amplifikován určitý úsek DNA a následně jsou čteny nukleotidy jeden po druhém, při sekvenování nové generace (NGS, z angl. Next Generation Sequencing) je DNA fyzikálně či enzymaticky rozdělena na malé fragmenty. Každý fragment je následně namnožen a přečten. Na trhu dnes existuje několik dominantních NGS platforem, z nichž se mezi nejpoužívanější řadí sekvenátory společnosti Illumina, které k amplifikaci DNA používají tzv. můstkovou (bridge) PCR, při níž jsou jednotlivé fragmenty přichyceny k průtokové komůrce pomocí primerů, a na ní dochází k amplifikaci a tím tvorbě shluků (80).

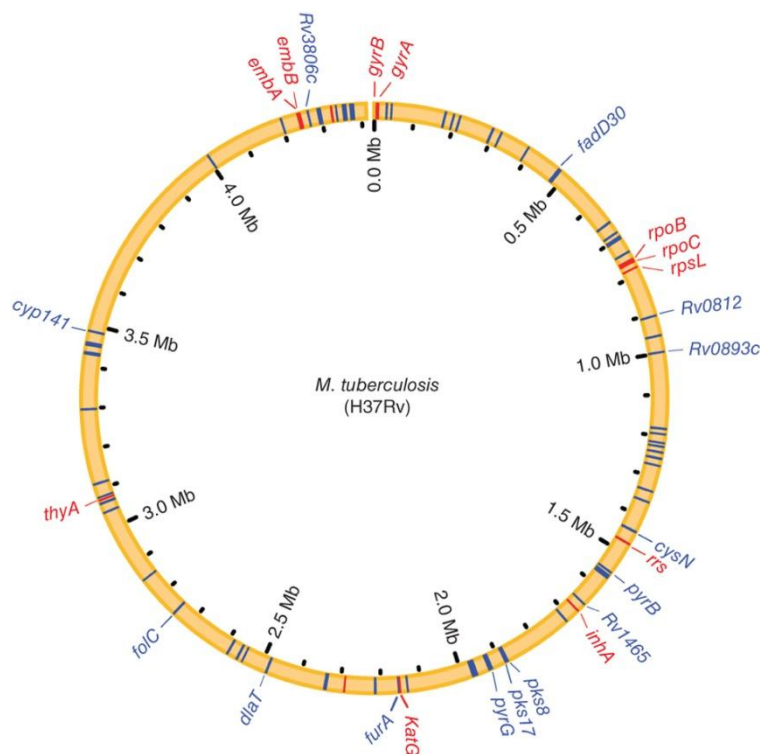
Tyto nové metody jsou dnes často využívána pro zjištění zdroje nákazy při epidemiích tuberkulózy a umožňují tak získat spolehlivější informace o příbuznosti bakterií z různých izolátů. Například v roce 2013 byla publikována studie německých mikrobiologů z Forschungszentrum Borstel, při níž byly ověřovány výsledky zkoumání epidemie probíhající v Německu v letech 1997 – 2010. Během této rozsáhlé epidemie onemocnělo 2 301 lidí. Teprve po vyhodnocení výsledků jednonukleotidových polymorfismů v jednotlivých izolátech získaných celogenomovým sekvenováním na sekvenátorech nové generace společnosti Illumina bylo zjištěno, že epidemie měla několik zdrojů. Výsledky se tak výrazně lišily od závěrů tradičního genotypizování bakterií, které bylo prováděno v počátcích epidemie pomocí metody fingerprintu a které přiřazovalo vznik epidemie jedinému zdroji (81, 82, 83).

Podobný případ, kdy osekvenování celého genomu izolátů bakterií pomohlo odhalit původce nákazy, byl popsán již v roce 2011 v Kanadě. Jednalo se o epidemii menšího rozsahu, kdy bylo postiženo tuberkulózou 41 lidí s těsnými sociálními vazbami. Pomocí metody fingerprintu se mezi bakteriemi získanými od jednotlivých pacientů nepodařilo odhalit žádné odlišnosti, proto byla zvolena celogenomová sekvenační analýza. V Centru pro kontrolu nemocí v Britské Kolumbii bylo osekvenováno celkem 36 izolátů bakterií na přístroji Genome Analyzer II sequencer (Illumina, USA). Analýza sekvenačních dat také zde objevila dva geneticky odlišné původce s identickými MIRU-VNTR genotypy, což naznačuje dvě původní ohniska nákazy. Obě linie však pocházejí ze stejného předka, který byl ve

společenství zjištěn již před vypuknutím epidemie. Další epidemiologická šetření také odhalila, že doba vypuknutí epidemie se shodovala s obdobím nárůstů užívání drog v této komunitě (82, 83).

### 7.8.5.2 Geny zodpovědné za rezistenci vůči antituberkulotikům

Největším problémem, se kterým se lékaři po celém světě setkávají, jsou multirezistentní (MDR) a extenzivně rezistentní (XDR) kmeny tuberkulózy, jejichž rezistence může vést k riziku, že se tato nemoc stane neléčitelnou. Mechanismy rezistence *M. tuberculosis* na léky je dnes pochopena pouze částečně, také zde mohou být vědcům velmi nápomocny nové molekulárně genetické metody. V roce 2013 byly v čínském Biofyzikálním institutu Akademie věd sekvenovány genomy bakterií ze 161 izolátů s řadou profilů rezistence vůči lékům. Výsledky studie dokázaly, že genetický základ rezistence je mnohem složitější, než se původně předpokládalo. Bylo identifikováno celkem 72 nových genů, 28 intergenových oblastí (IGRs), 11 nesynonymních jednonukleotidových polymorfismů (SNP, single-nucleotide polymorphism) a 10 IGR SNP, které jsou dávány právě do souvislosti s rezistencí na antituberkulotickou léčbu. Všechny geny jsou znázorněny na obrázku 19 (červeně známé geny, modře geny nově popsané) (44).



Obr. 19: Nově popsané geny zodpovědné za rezistenci v genomu *M. tuberculosis* (44)

## 8. DISKUZE

Mezi hlavní problémy v boji proti vážnému onemocnění, kterým tuberkulóza i dnes zůstává, patří zejména absence dostatečně účinné vakcíny bez velkého množství nežádoucích účinků. Právě vysoké množství vedlejších účinků po očkování, dále klesající relativně nízká incidence tuberkulózy na našem území a fakt, že z hlediska prevence je Česká republika na velice dobré úrovni a má zaveden kvalitní systém hlášení záchytu onemocnění, bylo po vzoru evropských států v ČR celoplošné očkování v roce 2011 zrušeno. Přispěly k tomu závěry Světové zdravotnické organizace, která do té doby používanou vakcínu označila jako neúčinnou. Na druhou stranu však příznivci celoplošné vakcinace argumentují průzkumy, které dokazují významně zvyšující se incidenci onemocnění v zemích, kde již bylo celoplošné očkování zrušeno dříve. Je tedy otázkou, zda z důvodu zrušení celoplošného očkování, nedojde ke zvýšení výskytu TBC včetně její latentní formy v naší populaci.

Pochybnosti o udržení klesající incidence v ČR jsou důvodem k otevření diskuze také v souvislosti s aktuální uprchlickou vlnou, kdy do Evropy míří statisíce běženců ze zemí, kde je výskyt tuberkulózy na daleko vyšší úrovni, než je tomu u nás či v okolních státech. Situace je o to horší, když se do naší republiky s rozvojem cestovního ruchu a migrace, dostávají osoby nakažené kmeny tuberkulózy, proti nimž neexistuje dostupná léčba. Dnes je zřejmé, že zásadnější průlom v celé otázce přinese až vyvinutí nové bezpečné a účinné vakcíny proti tomuto onemocnění. Ve vývoji je dnes řada očkovacích látek, jejich využití v praxi je však stále problematické.

Další z překážek, se kterými se lidstvo potýká, je spolu s vývojem účinné vakcíny i vývoj nových léků proti rezistentním formám TBC. Globální výskyt multirezistentní tuberkulózy (MDR-TBC) bude i nadále narůstat, jestliže se nezintenzivní snahy o její potlačení a nevyřeší překážky, které brání výzkumu lepších kombinací léků, rozšiřování léčby a včasné diagnostiky. Zlepšit neuspokojivé výsledky mohou nové léky účinné proti MDR-TBC, které výrazně zkracují dobu léčby a jsou méně toxické. Velké naděje jsou také vkládány do výzkumu genů, které odpovídají za rezistenci mykobakterií a jejichž studium by mohlo vést ke zjednodušení boje proti multirezistentním a extenzivně rezistentním formám tuberkulózy. Například v roce 2013 se právě díky moderním metodám sekvenování podařilo odhalit řadu genů, které jsou za rezistenci zodpovědné. Výzkum v této oblasti trvá a lze

předpokládat, že výsledky těchto studií budou silným nástrojem pro účinnou a cílenou terapii pro boj s rezistentními kmeny.

Stejně jako v oblasti prevence, tak i v diagnostice nezaostávají naše laboratoře za světovou špičkou. V rutinní diagnostice jsou využívány amplifikační testy pro rychlou identifikaci původců tuberkulózy. Tyto testy však vykazují vysoké procento falešně pozitivních výsledků, které je tak vždy nutné ověřovat paralelně dalšími kultivačními a mikroskopickými vyšetřeními (65). Tuto skutečnost však vyvažuje možnost okamžitého zavedení preventivních opatření při podezření na tuberkulózu. Mezi hlavní výzvy v oblasti diagnostiky můžeme zařadit včasný průkaz latentní tuberkulózy a testování rezistence mykobakteriálních kmenů na různé skupiny léků.

Pro diagnostiku latentní tuberkulózy se velmi osvědčil QuantiFERON-TB Gold test, který byl již do dnešního dne schválen řadou národních autorizačních institucí (např. FDA a EU) a jehož citlivost je výrobcem uváděna u aktivní formy tuberkulózy 89 %. Bylo však zjištěno několik úskalí při používání tohoto typu testu. Jedním z nich jsou problémy při testování osob mladších 18 let, kde bylo pozorováno zvýšené množství falešně pozitivních i falešně negativních výsledků oproti dospělé populaci. Další nevýhodou je jeho relativně vysoká cena. Naopak mezi výhody testu patří malá zátěž pro pacienta, vysoká specifita a nízké množství falešně pozitivních reakcí u dospělých pacientů. Výsledky v oblasti výzkumu genové exprese dnes naznačují, že by brzy mohly být uvedeny na trh i další testy podobné metodě Quantiferon, které by zjišťovaly hladiny jiných látek tvořených imunitním systémem jako odpověď na styk s mykobakteriemi a byly by tak významným pomocníkem v detekci pacientů s LTBI (84, 85).

## 9. ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem shrnula dosavadní poznatky o tuberkulóze, jejich původcích a diagnostice. V jednotlivých kapitolách jsem se věnovala historii, prevenci, léčbě, ale především rutinním i novým vyšetřovacím a léčebným postupům, které jsou využívány v boji proti tomuto zákeřnému onemocnění. Z hlediska prevence a sledování tuberkulózy dnes můžeme konstatovat, že je v České republice na velmi vysoké úrovni. K zachování tohoto stavu je však bezpodmínečně nutné zlepšit diagnostiku latentně nakažených jedinců. Zde je významným přínosem rutinní zavádění testu Quantiferon. Díky výzkumu genové exprese lze však brzy očekávat v rutinní diagnostice i další podobné testy. Bohužel v rozvojových státech je situace odlišná. Zde musíme nadále šíření infekce především předcházet a dokázat včas určit a účinně léčit nemocného jedince s aktivní tuberkulózou.

Nové vyšetřovací postupy, se kterými se dnes v našich laboratořích setkáváme, přinesly do diagnostiky *Mycobacterium tuberculosis* několik nových faktorů. Především umožňují zkrátit celkovou dobu vyšetření, což je u pomalu rostoucích mykobakterií velmi přínosné. Tyto metody také dokázaly zvýšit citlivost vyšetření, avšak mnohdy na úkor vyššímu procentu falešně pozitivních výsledků. Třetím faktorem je zpřesnění diagnostiky, kdy jsou nové sekvenční metody schopny přesně určit původce epidemie či geny, které jsou zodpovědné za lékovou rezistenci. I přes obrovský vědecký a technologický vývoj v oblasti mikrobiologické diagnostiky, lze stále klasické metody, mezi které patří především mikroskopie a kultivace, považovat za zlatý standard mykobakteriální diagnostiky.



## 10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

μm	Mikrometr
AMTD	Amplified <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> Direct, přímý amplifikační test pro diagnostiku <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ART	acidorezistentní tyčinky
ATP	Adenosine Triphosphate, adenosin trifosfát
BCG	Bacillus Calmette-Guerin, bacil Calmettův-Guérinův
Bp	Basepair, páry bází
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
dATP	deoxyadenosintrifosfát,
dCTP	deoxycytosintrifosfát,
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
DTP	Deoxyguanosintrifosfát
dTTP	deoxythymidintrifosfát,
EMB	Etambutol
EU	European Union, Evropská Unie
FDA	Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HIV	Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunodeficiency
HPA	Hybridization Protection Assay, test hybridizační ochrany
IGRA	Interferon gamma release assay, vyšetření stanovující uvolnění interferonu Gama
IL	Interleukin
INF-γ	interferon gamma
INH	Isoniazid
LTBI	Latent Tuberculosis Infection, latentní tuberkulózní infekce
MDR-TBC	Multidrug-resistant tuberculosis, multirezistentní tuberkulóza
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
MIRU-VNTR	mycobacterial interspersed repetitive units - variable number tandem repeats, variabilní počet tandemových repetitivních jednotek
mRNA	messenger ribonucleic acid, mediátorová ribonukleová kyselina
MT	Mantoux kožní test
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
NGS	Next Generation Sequencing, sekvenování nové generace

<i>NRAMP1</i>	natural resistance-associated macrophage protein 1, makrofágový protein asociovaný s přirozenou rezistencí
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce
pH	potential of hydrogen, potenciál vodíkových iontů
PZA	Pyrazinamid
qPCR	quantitative PCR, kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism, analýza délky restrikčních fragmentů
RIF	Rifampicin
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomal ribonucleic acid, ribozomální ribonukleová kyselina
RTG	vyšetření rentgenovým zářením
rt-PCR	Real-time PCR, polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SNP	single-nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus
STM	Streptomycin
TBC	Tuberkulóza
Th1	T helper cells, Th lymfocyty typu 1
Th2	T helper cells, Th lymfocyty typu 2
TMA	Transcription-mediated amplification, transkripční zprostředkovaná amplifikace
TNF	tumor necrosis factor, tumor nekrotizující faktor
UDG	uracil-DNA-glycosylase
UK	United Kingdom, Spojené království
USA	United States of America, Spojené státy americké
UV	ultraviolet, ultrafialové
WHO	World Health Organisation, Světová zdravotnická organizace
XDR-TBC	Extensively drug-resistant tuberculosis, široce rezistentní tuberkulóza

## 11. POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

1. Tuberculosis: Fact sheet N°104. *World Health Organization* [online]. 2015-03 [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
2. KAUFMANN, Stefan H E a Andrew J MCMICHAEL. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature Medicine*. 2005, 11(4s): 33-44
3. MURRAY, John F. A Century of Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2004, 169(11): 1181-1186.
4. HOMOLKA, Jiří a Vladimír VOTAVA. *Tuberkulóza*. 4., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2012, 74 s. ISBN 978-80-246-2070-1.
5. VOTAVA, Miroslav a Vladimír VOTAVA. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 4., upr. vyd. Brno: Neptun, 2003, xxii, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
6. Péče o nemocné s tuberkulózou. *Sestra*. Praha: Mladá fronta a. s., 1999, 8(7).
7. Současná problematika tuberkulózy - Světový den TBC. *Medicina.cz: První český zdravotnický portál* [online]. Olomouc, 2011, 2011-03-24 [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: <http://medicina.cz/clanky/8861/34/Soucasna-problematika-tuberkulozy-Svetovy-den-TBC/>
8. ÇAVUŞOĞLU, Cengiz. History of tuberculosis and tuberculosis control program in Turkey. *Microbiology Australia*. 2014, 35(3): 169-.
9. RYŠKOVÁ, O. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium*. 1. dotisk 1. vyd. Praha: Karolinum, 2007, 130 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-0135-9.
10. Historie OLÚ Albertinum. *Albertinum, : Odborný léčebný ústav* [online]. Žamberk [cit. 2015-07-20]. Dostupné z: [http://www.albertinum-olu.cz/o\\_nas/albertinska\\_historie/historie\\_olu\\_albertinum-detail\\_textovy\\_clanek-1-11-0-243.html](http://www.albertinum-olu.cz/o_nas/albertinska_historie/historie_olu_albertinum-detail_textovy_clanek-1-11-0-243.html)
11. KUBÍN, M. Začátky a konce masarykovy ligy proti tuberkulóze. I. díl. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL*, 2013, roč. 10, č. 1, s. 26-30. ISSN: 1802-0518.
12. POKORNÝ, Antonín, František SALAJKA a Zdeněk MERTA. *Tuberkulóza*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1998, 54 s. ISBN 80-210-1851-8.
13. JEŠINOVÁ, Hana. *Informovanost a zájem matek o očkování dětí proti tuberkulóze* [online]. Brno, 2012, 2012-04-24 [cit. 2015-05-12]. Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/388178/lf\\_b/Zajem\\_a\\_informovanost\\_matek\\_o\\_ockovani\\_deti\\_proti\\_tuberkuloze.pdf](http://is.muni.cz/th/388178/lf_b/Zajem_a_informovanost_matek_o_ockovani_deti_proti_tuberkuloze.pdf). Bakalářská práce. Masarykova Univerzita.
14. *Zdravotnická statistika*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2013, ISBN 1210-8685.
15. BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.

16. MACELA, A. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 215 s. ISBN 80-247-0664-4.
17. Registr tuberkulózy – RTBC. *Koordináční středisko pro resortní zdravotnické informační systémy*. [online]. [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: [http://www.ksrzis.cz/dokumenty/registr-tuberkulozy-rtbc\\_43\\_114\\_1.html](http://www.ksrzis.cz/dokumenty/registr-tuberkulozy-rtbc_43_114_1.html)
18. Schválen první nový lék proti tuberkulóze za posledních 50 let. *Lékaři bez hranic*. [online]. [cit. 2015-10-11]. Dostupné z: <http://www.lekari-bez-hranic.cz/cz/clanek/schvalen-prvni-novy-lek-proti-tuberkuloze-za-poslednich-50-let>
19. Antibiotika ovlivňující syntézu buněčné stěny. *Mikrobiologie.XF.CZ*. [online]. [cit. 2015-05-13]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.xf.cz/files/atb-bunecna-stena.doc.html>
20. Světový den TBC: na nová rizika jsme připraveni. *MedicalTibune.cz* [online]. [cit. 2015-11-17]. Dostupné z: <http://www.Tribune.cz/clanek/26390-svetovy-den-tbc-na-nova-rizika-jsme-pripraveni>
21. SOLOVIČ, Ivan a Zuzana KLIMENTOVÁ. Latentná tuberkulózná infekcia a biologická liečba. *Via Practica*. 2013, 10(3-4): 105-108.
22. MAČÁK, Jiří, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012, 347 s. ISBN 978-80-247-3530-6.
23. CLINTON, E. Barry a Maija S. CHEUNG. Nová taktika v boji proti tuberkulóze. *Scientific American - české vydání*. Praha: Espero Publishing, 2010, 9(2): 28-35.
24. KRAWIECOVÁ, Lucie. *Výběr a optimalizace metody pro laboratorní průkaz Mycobacterium tuberculosis H37 Rv ve vzorcích sputa: diplomová práce*. Brno: Masarykova Univerzita, 2007.
25. PTÁKOVÁ, M. Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterií. *Med praxi*. 2011, 8(11): 466-468.
26. AMLEROVÁ, Jana, Pavel ČERMÁK, Jana SVOBODOVÁ, Vít ULMANN a Ilona ZEMANOVÁ. *Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění: Národní standardní vyšetřovací postup* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [http://www.splm.cz/dokumenty/NSVP7\\_navrh1.pdf](http://www.splm.cz/dokumenty/NSVP7_navrh1.pdf)
27. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie II: přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 309 s. ISBN 80-210-2272-8.
28. Acid-fast stain of Mycobacterium tuberculosis, from culture of lymph node aspirate. *Partners Healthcare System*[online]. [cit. 2015-06-20]. Dostupné z: <http://www.idimages.org/images/organismdetail/?imageid=1685&altimageid=155>
29. KUBÍN, M. *Vyšetřovací metody u mykobakteriálních infekcí*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1986, 122 s. Mikrobiologické vyšetřovací metody.
30. M. tuberculosis bacilli visualised with an auramine stain. *Diary of a medical scientist* [online]. [cit. 2015-06-22]. Dostupné z: <http://fyeahmedlab.tumblr.com/post/28397741609/m-tuberculosis-bacilli-visualised-with-an>

31. Tuberculosis and rational vaccine design. *SciLogs* [online]. [cit. 2015-11-22]. Dostupné z: [http://www.scilogos.com/in\\_scientio\\_veritas/tb-rational-vaccine-design/](http://www.scilogos.com/in_scientio_veritas/tb-rational-vaccine-design/)
32. Kubín M., Schindler J., Ticháček B., Potužník V. (1998): Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí. Národní referenční laboratoř pro mykobakterie. SZÚ Praha ve spolupráci s firmou Trios, s.r.o.
33. SCHINDLER, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 223 s. ISBN 978-80-247-3170-4.
34. BACTEC 12B Mycobacteria Culture Vials Middlebrook 7H12. *Becton, Dickinson and Company* [online]. [cit. 2015-05-27]. Dostupné z: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=21442>
35. POKORNÝ, Antonín, František SALAJKA a Zdeněk MERTA. *Tuberkulóza*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1998, 54 s. ISBN 80-210-1851-8.
36. KOZÁKOVÁ, B. Comparison of efficacy of the rapid mycobacteria growth indicator tube (MGIT) culture method (manual system) and conventional culture method in mycobacterial detection. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2006, 55(1): 37-40.
37. REHEEM, Fadwa Abdel Mohammad, Amani Ali EL-KHOLY, Mervat Gaber Wahab ABDEL a Mohammed Ezzat Ahmed GHADA. *Correlation between Severity of Infection and Lymphocyte Subpopulations in Mycobacterium tuberculosis patients* [online]. Fayoum: Faculty of Medicine Fayoum University, 2013, 2015-11-22 [cit. 2015-11-22]. Dostupné z: [http://www.fayoum.edu.eg/thesesdatabase/abstracts/Correlation%20between%20\\_ar.pdf](http://www.fayoum.edu.eg/thesesdatabase/abstracts/Correlation%20between%20_ar.pdf)
38. Scudellari, M. Outwitting the Perfect Pathogen. *The Scientist* [online]. [cit. 2015-05-27]. Dostupné z: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/38708/title/Outwitting-the-Perfect-Pathogen/>
39. Growth Detection Failures by the Nonradiometric Bactec MGIT 960 Mycobacterial Culture System. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. [cit. 2015-05-30]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/50/6/2092/F1.expansion.html>
40. HEIFETS, L., T. LINDER, T. SANCHEZ, D. SPENCER a J. BRENNAN. Two Liquid Medium Systems, Mycobacteria Growth Indicator Tube and MB Redox Tube, for Mycobacterium tuberculosis Isolation from Sputum Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, 38(3): 1227–1230.
41. Souprava BACTEC MGIT 960 SIRE: Pro testování antimykobakteriální citlivosti u Mycobacterium tuberculosis. *Dickinson and Company* [online]. 2010 [cit. 2015-05-30]. Dostupné z: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=18300>
42. Havelková, M., Mezenský L. Testování citlivosti Mycobacterium tuberculosis na základní antituberkulotika. *Doplněk k Doporučeným standardním metodám v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí. Zprávy CEM*. 2003, 12(9), 389-391.
43. GONÇALVES, Maria Gisele, Rosangela SIQUEIRA OLIVEIRA, Maristela MARQUES SALGADO, Lee H HARRISON, Kathleen A SHUTT a Claudio TAVARES SACCHI. Fast test for assessing the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampin by real-time PCR. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012, 107(7): 903–908.

44. ZHANG, Hongtai, Dongfang LI, Lili ZHAO, Joy FLEMING, Nan LIN, Ting WANG, Zhangyi LIU, Chuanyou LI, Nicholas GALWEY, et al. Genome sequencing of 161 Mycobacterium tuberculosis isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance. *Nature Genetics*. 2013, 45(10): 1255-1260.
45. BLAIR, Hannah A. a Lesley J. SCOTT. Delamanid: A Review of Its Use in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Drugs*. 2015,75(1), 91-100
46. CONNELL, Tom G., Nicole RITZ, Georgia A. PAXTON, Jim P. BUTTERY, Nigel CURTIS, Sarath C. RANGANATHAN a Keertan DHEDA. A Three-Way Comparison of Tuberculin Skin Testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in Children. *PLoS ONE*. 2008, 3(7): e2624.
47. QuantiFERON® -TB Gold (QFT® ) ELISA. *Qiagen QuantiFERON* [online]. [cit. 2015-06-12]. Dostupné z: <http://www.quantiferon.com/irm/content/PI/QFT/2PK/CS.pdf>
48. Identifikace mikroorganismů pomocí sekvence jejich genu pro 16S rRNA. *VŠCHT* [online]. Praha, 2015-08-10 [cit. 2015-12-19]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Identifikace+mikroorganism%C5%AF+pomoc%C3%AD+sekvence+jejich+genu+pro+16S+rRNA.pdf>
49. DNA SEQUENCE ANALYSIS. *Alimetrics*. [online]. [cit. 2015-09-21]. Dostupné z: <http://www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis>
50. ALONSO, Henar, Sofia SAMPER, Carlos MARTÍN a Isabel OTAL. Mapping IS6110 in high-copy number Mycobacterium tuberculosis strains shows specific insertion points in the Beijing genotype. *BMC Genomics*. 2013, 14(1): 422.
51. GeneProof catalog 2015. *GeneProof*. [online]. [cit. 2015-08-11]. Dostupné z: <http://www.geneproof.com/upload/files/9b5ddde392c726d/geneproof-katalog-2015.pdf>
52. SUPPLY, P (2010). MIRU-VNTR typing: the new international standard for TB molecular epidemiology. In *TUBERCULOSIS Application of genetics- and genomics-based tools for diagnosis, drug susceptibility testing and epidemiology*. Lille:Institut Pasteur de Lille, 2010. s. 2. Dostupné z: [http://www.moleculartb.org/gb/pdf/transcriptions/08\\_Supply\\_2109.pdf](http://www.moleculartb.org/gb/pdf/transcriptions/08_Supply_2109.pdf)
53. PETRÁŠ, Marek a Ivana K LESNÁ. *Manuál očkování 2010*. 3. vyd. [Praha: Marek Petráš], 2010, 650 s. ISBN 978-80-254-5419-0.
54. NYKODÝMOVÁ, Pavla. Proč je chybou zrušit přeočkování proti tuberkulóze? *Medical Tribune* [online]. 2009, (12) [cit. 2015-11-19]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/13746-proc-je-chybou-zrusit-preockovani-proti-tuberkuloze>
55. LEE, Myungsun, Jongseok LEE, Matthew W. CARROLL, Hongjo CHOI, Seonyeong MIN, Taeksun SONG, Laura E. VIA, Lisa C. GOLDFEDER, Eunhwa KANG, et al. Linezolid for Treatment of Chronic Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*. 2012, 367(16): 1508-1518.
56. NARAYANAN, Sujatha a Srinidhi DESIKAN. Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in Mycobacterium tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research*. 2015, 141(6): 761

57. GOYAL, Renu, Rajeev THAKUR a Smita SARMA. Comparison of DNA extraction protocols for Mycobacterium Tuberculosis in diagnosis of tuberculous meningitis by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2011, 3(4): 353-356
58. MagNA Pure Compact Instrument. *Life Science*. [online]. [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <https://lifescience.roche.com/shop/products/magna-pure-compact-instrument>
59. ANOCHIE, Philip Ifesinachi, Edwina C ONYENEKE, Angelina C OGU, Anthony C ONYEOZIRILA, Srikanth ALURU, Nneka ONYEJEPU, Jian ZHANG, Lauretta EFERE, Mariam A ADETUNJI, et al. Recent advances in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. *GERMS*. 2012, 2(3): 110-120.
60. Polymerase Chain Reaction. *Biology 3400 Genetics*. [online]. [cit. 2015-02-05]. Dostupné z: <http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch19/PCR.html>
61. GeneProof Mycobacterium tuberculosis PCR Kit. *GeneProof*. [online]. [cit. 2015-09-20]. Dostupné z: <http://www.geneproof.com/cz/produkty/humanni-mikrobiologicka-diagnostika/geneproof-mycobacterium-tuberculosis-pcr-kit>
62. GUDNASON, H., M. DUFVA, D.D. BANG a A. WOLFF. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research*. 2007, 35(19): e127-e127
63. Mycobacterium tuberculosis PCR Kit – příbalový leták. *GeneProof*. [online]. [cit. 2015-09-18]. Dostupné z: <http://www.geneproof.com/upload/files/f2199a542d511d3/qmt-004-15-02cz.pdf>
64. Amplified MTD test. *Hologic*. [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://www.hologic.com/products/clinical-diagnostics-blood-screening/assays-and-tests/amplified-mtd-test>
65. LÁSIKOVÁ Š, Buncová M, Sýkorová B, Gabrielová A, Horová B, Nyčová E, Machová A, Moravcová L. Průkaz tuberkulózy pomocí molekulárně genetických metod: polymerázové řetězové reakce (PCR) a Amplified Mycobacterium tuberculosis direct (AMTD) test. *Klin mikrobiol inf lék* 2006;12(5):195-199
66. MADKOUR, M. Textbook of tuberculosis. New York: Springer, 2003, p. cm. ISBN 3540014411.
67. KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.
68. BIFANI, Pablo, Natalia KUREPINA, Barun MATHEMA, Xiao-Ming WANG a Barry KREISWIRTH. *Genotyping of Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates Using IS6110-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis* [online]. s. 173 [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-999-4\\_14](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-999-4_14)
69. WARREN, R., M. DE KOCK, E. ENGELKE, R. MYBURGH, N. GEY VAN PITTIUS, T. VICTOR a P. VAN HELDEN. Safe Mycobacterium tuberculosis DNA Extraction Method That Does Not Compromise Integrity. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006, 44(1), 254-256.
70. Microbiology – Spring 2009 Study Guide 13. *Geneseo*. [online]. [cit. 2015-11-08]. Dostupné z: [http://www.geneseo.edu/~simon/bio230/class/mic\\_class13\\_10.pdf](http://www.geneseo.edu/~simon/bio230/class/mic_class13_10.pdf)

71. Spoligotypizace *Mycobacterium tuberculosis* komplex. *Masarykova Univerzita*. [online]. [cit. 2015-10-01]. Dostupné z: [http://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/Bi7722/um/35767401/Spoligotypizace\\_Mycobacterium\\_tuberculosis\\_complex-STUDENTI.pdf](http://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/Bi7722/um/35767401/Spoligotypizace_Mycobacterium_tuberculosis_complex-STUDENTI.pdf)
72. VAN DER ZANDEN, A. G. M., K. KREMER, L. M. SCHOOLS, K. CAIMI, A. CATALDI, A. HULLEMAN, N. J. D. NAGELKERKE a D. VAN SOOLINGEN. Improvement of Differentiation and Interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by Introduction of New Spacer Oligonucleotides. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002, 40(12), 4628-4639
73. BARNES, Peter F. a M. Donald CAVE. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *New England Journal of Medicine* [online]. 2003,349(12), 1149-1156
74. MIRU-VNTR typing: the new international standard for TB molecular epidemiology. *Molecular Tuberculosis*. [online]. [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: [http://www.molecular-tb.org/gb/pdf/transcriptions/08\\_Supply\\_2109.pdf](http://www.molecular-tb.org/gb/pdf/transcriptions/08_Supply_2109.pdf)
75. JAFARIAN, Mehdi, Aghali-Merza MUAYED, Farnia PARISSA a Ahmadi MOJTABA. Synchronous Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Epidemiology Strains by “MIRU-VNTR” and “MIRU-VNTR and Spoligotyping” Technique. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2010, 2(3), 145–152.
76. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Center for Disease Control and Prevention*. [online]. 25.5.2010 [cit. 2015-05-13]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5905a1.htm>
77. BERRY, Matthew P. R., Christine M. GRAHAM, Finlay W. MCNAB, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*. 2010-8-19, 466(7309), 973-977.
78. COLE, S. T., R. BROSCH, J. PARKHILL, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998-6-11, 393(6685), 537-544.
79. MACELA, Aleš. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. 1. vyd. Praha: Grada, c2006, 215 s. Malá monografie. ISBN 80-247-0664-4.
80. GARDY, Jennifer L., James C. JOHNSTON, Shannan J. Ho SUI, et al. Whole-Genome Sequencing and Social-Network Analysis of a Tuberculosis Outbreak. *New England Journal of Medicine*. 2011, 364(8), 730-739.
81. ROETZER, Andreas, Roland DIEL, Thomas A. KOHL, et al. Whole Genome Sequencing versus Traditional Genotyping for Investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* Outbreak: A Longitudinal Molecular Epidemiological Study. *PLoS Medicine*. 2013-2-12, 10(2), e1001387-
82. DIEL, R., S. RUSCH-GERDES a S. NIEMANN. Molecular Epidemiology of Tuberculosis among Immigrants in Hamburg, Germany. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, 42(7), 2952-2960.
83. KOHL, T. A., R. DIEL, D. HARMSSEN, J. ROTHGANGER, K. M. WALTER, M. MERKER, T. WENIGER a S. NIEMANN. Whole-Genome-Based *Mycobacterium tuberculosis*



Surveillance: a Standardized, Portable, and Expandable Approach. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014, 52(7), 2479-2486.

84. VROBLOVÁ V., JANKOVIČOVÁ K., TROJÁČKOVÁ-KUDLOVÁ M., KREJSEK J. DETEKCE LATENTNÍ TUBERKULÓZY QUANTIFERON-TB GOLD TEST, MOŽNOSTI A ÚSKALÍ METODY [online]. [cit. 2015-06-12]. Dostupné z: [http://www.prolekare.cz/prakticky-lekar-clanek/detekce-latentni-tuberkulozy-quantiferon-tb-gold-test-moznosti-a-uskali-metody-5542?confirm\\_rules=1](http://www.prolekare.cz/prakticky-lekar-clanek/detekce-latentni-tuberkulozy-quantiferon-tb-gold-test-moznosti-a-uskali-metody-5542?confirm_rules=1)
85. KŘEPELA, K.. Chemoprolaxa TBC u dětí do 18 let.. *Spolek smluvních pneumoftizeologů*. [online]. [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: [http://www.sspf.cz/files/Dokumenty/Chemoprolaxa\\_u\\_deti\\_do\\_18\\_let\\_defin\\_verze\\_%282011%29.pdf](http://www.sspf.cz/files/Dokumenty/Chemoprolaxa_u_deti_do_18_let_defin_verze_%282011%29.pdf)
86. Global Tuberculosis report 2015. *World Health Organization*. [online]. [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1)