



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Diagnostika plicní tuberkulózy**

**Bakalářská práce**

Studijní program:

Zdravotní laborant

**Autor:** Lenka Chaloupková

**Vedoucí práce:** MUDr. Petra Dovinová

České Budějovice 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Diagnostika plicní tuberkulózy*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2017

.....  
Lenka Chaloupková

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce MUDr. Petře Dovinové za cenné rady a připomínky, odborné vedení práce, vstřícnost, ochotu a především za trpělivost.

Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Pavlu Žampachovi za poskytnutí podkladů z Pracoviště imunologie, MUDr. Zuzaně Liptákové za poskytnutí podkladů z Plicní léčebny Nemocnice České Budějovice, a.s. a v neposlední řadě RNDr. Pavlíně Tinavské, Ph.D. za její ochotu a čas, který vzniku této práce věnovala.

## Diagnostika plicní tuberkulózy

### Abstrakt

Tuberkulóza (TBC) představuje i v 21. století významný medicínský a sociální problém. Otevření hranic, zvýšená migrace obyvatel, rozvoj pandemie AIDS a s tím související nárůst počtu pacientů se sníženou imunitou vede k tomu, že tuberkulóza i nadále zůstává jednou z hlavních příčin úmrtí na celém světě. Původcem onemocnění je acidorezistentní bakterie *Mycobacterium tuberculosis* komplex, která je schopná přežít v lidském organismu řadu let. Příznaky onemocnění nejsou charakteristické, a tak právě včasná diagnostika je nezbytná pro odhalení nově vzniklých onemocnění. Zlatým standardem zůstává i nadále bakteriologické vyšetření založené na mikroskopickém vyšetření a kultivaci materiálu. K dispozici jsou také rychlé molekulárně genetické techniky a metody založené na imunitní odpovědi organismu.

Pro tuto práci byla použita data z Plicní léčebny Nemocnice České Budějovice, a.s. za období 2008 – 2016, a dále data získaná z Pracoviště imunologie, taktéž v Nemocnici České Budějovice, a.s. Cílem práce bylo vytvořit statistický přehled pacientů s potvrzenou plicní tuberkulózou dle věku a pohlaví za období 2008 – 2016. Dále pak porovnání tuberkulinového kožního a quantiferonového testu u pacientů s plicní tuberkulózou za období 2008 – 2016. Realizaci a vyhodnocení výsledků quantiferonového testu u pacientů za rok 2016 se věnuji v závěru práce. Metodika spočívala především ve sběru potřebných dat a jejich vyhodnocení.

Z výsledků vyplývá, že z dat získaných z Plicní léčebny, byla u 81 pacientů potvrzena plicní tuberkulóza. V 75 % se jednalo o muže, pouze ve 25 % o ženy. U mužů i u žen byl výskyt TB zaznamenán ve všech zvolených věkových kategoriích. U mužů pak nejčastěji ve věkové kategorii 31 – 50 a 51 – 70 let. Tuberkulinový kožní test (PPD) a quantiferonový (QF) test byly zároveň provedeny u 62 % pacientů. Pouze u 7 % pacientů nebyl proveden ani jeden z testů. Při porovnání obou testů byl v 64 % pozitivní jak PPD tak i QF test. Dále je z výsledků patrné, že quantiferonový test je citlivější než tuberkulinový kožní test. Quantiferonový test byl za rok 2016 vyhodnocen samostatně z hlediska pozitivního a negativního výsledku, pozitivní výsledek byl porovnán s bakteriologickým vyšetřením. Dále byl QF test vyhodnocen z hlediska pohlaví, věku, diagnózy a zasílajícího oddělení. Poměrně významným zjištěním bylo, že i přes to, že QF test je citlivějším testem, u více než třetiny pacientů

s pozitivním výsledkem QF testu nebyl požadavek na průkaz mykobakterií vůbec zadán. V porovnání s bakteriologickým vyšetřením se TBC potvrdila u 14 % pacientů.

Přesto, že Česká republika se řadí mezi země s nízkým výskytem tuberkulózy, nelze tuto skutečnost podceňovat. Pocit veřejnosti, že tohoto onemocnění se není třeba obávat, dozajisté umocnil i souhlas se zrušením plošné vakcinace, který platí od 1. 11. 2010. Také řada lékařů již nebere toto onemocnění při diferenciální diagnostice v úvahu. Nicméně edukace především laické veřejnosti v tomto směru je nezbytná.

### **Klíčová slova**

*Mycobacterium tuberculosis*; tuberkulóza; tuberkulinový kožní test (PPD); quantiferonový test (QF); mikroskopie; kultivace

## **The diagnosis of pulmonary tuberculosis**

### **Abstract**

Even in 21st century tuberculosis (TBC) pose a significant medical and social problem. Open borders intensified migrations, expansion of AIDS pandemic and related increase of patients with reduced immunity are all reasons why tuberculosis still remains one of the main causes of death all over the world. The disease originator is *Mycobacterium tuberculosis*, an acidoresistent bacteria that is able to survive in a human organism for a lot of years. Symptoms of the disease are not characteristic, that is why the correct diagnosis is essential to reveal the new cases of the disease. One of the standards to stay is bacteriological examination based on microscopic examination and cultivation of the material. Also rapid molecular genetic techniques and methods based on the immune response are available.

This work uses data gained from Plicní léčebna Nemocnice České Budějovice, a.s. (Pulmonary Department of Hospital in České Budějovice) for the period of 2008-2016, as well as data gained from Pracoviště imunologie (Immunology Department) in Nemocnice České Budějovice, a.s. The goal of the work was to create a statistical overview of patients with confirmed pulmonary tuberculosis according to age and gender for the period of 2008-2016. Next it aims at comparison of tuberculin skin test and quantiferon test in patients with pulmonary tuberculosis for the period of 2008 - 2016. Implementation and evaluation of the quantiferon test in patients in 2016 are the end of my work. The methodology was mainly based on gathering the necessary data and their evaluation.

Results show that pulmonary tuberculosis was confirmed in 81 patients in relation to data obtained from the Pulmonary Department. Of that 75% were male and only 25% female. For both sexes, the occurrence of tuberculosis was on record in all age categories. In men most often at the age of 31-50 and 51-70. Tuberculin skin test (PPD) and quantiferon (QF) test were also accomplished in 62% of patients. Only in 7% patients none of the tests was done. When the two tests were compared, both PPD and QF tests were positive in 64%. Also the results show that the quantiferon test is more sensitive than the tuberculin skin test. The quantiferon test was evaluated separately for the positive and negative results, positive result was compared with bacteriological examination. Next the QF test was evaluated from the point of view of gender, age, diagnosis and engaged department. A relatively significant finding was that even though

the QF test is more sensitive, for more than a third of patients with the positive QF test result, mycobacterial identification was not required at all. Compared to bacteriology examination TB was confirmed in 14% of patients.

Despite the fact that the Czech Republic ranks among the countries with a low incidence of tuberculosis, this fact can not be underestimated. The public's feeling that there is no need to worry about this illness has also been supported by the approval of the cancellation of flat vaccinations, effective from 1. 11. 2010. Also, a number of physicians are no longer taking this disease into account while making diagnosis. However, education of lay public is essential above all in this issue.

**Key words**

*Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; tuberculin skin test (PPD); quantiferon test (QF); microscopy; cultivation

# Obsah

Úvod .....	11
1. Základní poznatky o tuberkulóze .....	13
1.1 Definice tuberkulózy .....	13
1.2 Historie tuberkulózy.....	13
1.3 Etiologie tuberkulózy .....	14
1.4 Epidemiologie tuberkulózy .....	15
1.4.1 Údaje uváděné Světovou zdravotnickou organizací (WHO) .....	15
1.4.2 Tuberkulóza v České republice.....	15
1.5 Patogeneze.....	16
1.5.1 Manifestní tuberkulóza .....	16
1.5.1.1 Primární tuberkulóza.....	16
1.5.1.2 Postprimární tuberkulóza .....	17
1.5.2 Latentní tuberkulóza .....	18
1.6 Klinický obraz .....	18
1.7 Imunitní odpověď na <i>M. tuberculosis</i> .....	19
1.7.1 Iniciace obranné zánětlivé reakce.....	19
1.7.2 Časná fáze obranné zánětlivé reakce.....	19
1.7.3 Vrcholná fáze obranné zánětlivé reakce.....	19
1.7.4 Pozdní fáze obranné zánětlivé reakce.....	20
1.8 Diagnostika plicní tuberkulózy .....	20
1.8.1 Fyzikální nález .....	20
1.8.2 Radiologický nález.....	20
1.8.3 Laboratorní vyšetření .....	21
1.8.3.1 Odběr materiálu.....	21
1.8.3.2 Mikroskopie.....	21
1.8.3.2.1 Metoda barvení dle Ziehl – Neelsena .....	22
1.8.3.2.2 Fluorescenční barvení .....	23
1.8.3.3 Kultivace.....	23
1.8.3.4 Molekulárně genetické techniky.....	26
1.8.3.5 Vyšetřování citlivosti .....	27
1.8.3.6 IGRA (interferon gamma release assay) testy.....	28
1.8.3.6.1 Quantiferon – TB - Gold test .....	28



1.8.3.6.2 T – SPOT TB test .....	28
1.8.4 Sérodiagnostika .....	29
1.8.5 Tuberkulinový kožní test .....	29
1.9 Léčba tuberkulózy .....	29
1.9.1 Antituberkulotika .....	30
1.9.2 Léčebné režimy .....	31
1.9.3 Rezistentní formy tuberkulózy .....	31
1.10 Prevence.....	33
1.10.1 BCG vakcinace .....	33
1.10.2 Chemoprofylaxe .....	34
1.11 Povinné hlášení tuberkulózy .....	34
1.11.1 Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR - ÚZIS .....	35
1.11.2 Registr tuberkulózy (RTBC).....	35
2. Cíl práce a hypotézy .....	37
2.1 Cíle práce.....	37
2.2 Hypotézy .....	37
3. Metodika .....	38
3.1 Tuberkulinový kožní test .....	38
3.1.1 Hodnocení testu.....	39
3.2 QuantiFERON – TB Gold In – Tube (IT) test.....	41
3.2.1 Použití testu .....	41
3.2.2 Princip testu .....	41
3.2.3 Činidla a potřebné vybavení.....	42
3.2.4 Odběr vzorku a manipulace s ním.....	43
3.2.5 Pracovní postup.....	43
3.2.6 Interpretace výsledků .....	43
4. Výsledky .....	46
4.1 Distribuce pacientů s plicní tuberkulózou dle věku a pohlaví ve vzorku populace za období 2008 – 2016 .....	46
4.2 Porovnání tuberkulinového kožního (PPD) a quantiferonového (QF) testu u pacientů s plicní tuberkulózou za období 2008 – 2016 .....	49
4.3 Realizace a vyhodnocení výsledků quantiferonového testu u pacientů za rok 2016 .....	52
5. Diskuse .....	58
6. Závěr.....	61
7. Seznam použité literatury .....	62

8. Přílohy .....	67
9. Seznam zkratek .....	70

## Úvod

Tuberkulóza provázela lidstvo ve všech historických i prehistorických obdobích a provází jej doposud. Přesto, že původce tohoto onemocnění známe již více než sto let a základní antituberkulotika jsou dispozici více než 50 let, představuje tuberkulóza i nadále celosvětovou hrozbu. Chronický průběh nemoci, dlouhotrvající léčba a nedostupnost preventivních opatření a léčby má za následek epidemiologickou závažnost nemoci. Vzhledem k tomu, že tuberkulóza postihuje především obyvatele sociálně slabší, je důležité, aby byla prevence zaměřena především na tyto jedince a sociální skupiny. Situace v České republice je poměrně příznivá. Počet nových případů stále klesá a řadíme se tak mezi země s nízkým výskytem tohoto onemocnění. Pro zachování tohoto příznivého stavu je však důležité na tuberkulózu nezapomínat a nemocné včas diagnostikovat, izolovat a léčit (Vašáková, © 2013).

Původcem onemocnění je *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Téměř všechny případy tuberkulózy v ČR jsou vyvolány *M. tuberculosis*, už pouze výjimečně je původcem onemocnění v ČR *M. bovis*. Onemocnění ostatními druhy je zcela raritní (Svobodová, 2013). Nález etiologického agens (*Mycobacterium tuberculosis*) dokumentoval v březnu roku 1882 německý lékař a mikrobiolog **Robert Koch**. Podrobně popsal morfologické, kultivační a biologické vlastnosti původce, a proto se pro něj též používá termín BK – bacil Kochův (Homolka et al., 2012). Za svůj objev byl oceněn v roce 1905 Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu a na jeho počest byl 24. březen vyhlášen Světovou zdravotnickou organizací (WHO) „Světovým dnem boje proti tuberkulóze.“

V současnosti je epidemiologická situace naprosto rozdílná v rozvinutých zemích, kde výskyt tuberkulózy obecně klesá a v zemích s nízkou životní úrovní, kde je situace velmi nepříznivá vzhledem k vysokému počtu nemocných. Po AIDS je tuberkulóza druhou nejčastější smrtící infekční chorobou na světě. V roce 2015 bylo zaznamenáno 10,4 miliónů nových případů, z čehož lidé infikovaní HIV představovali 11 %, tedy 1,2 miliónů případů (Global tuberculosis report, 2016).

Nejzávažnějším zdrojem nákazy je nemocný člověk, především ten, který vylučuje mykobakteria prokazatelné mikroskopicky. K přenosu dochází nejčastěji inhalační cestou. Onemocnění může probíhat klinicky manifestní nebo latentní formou. Nejčastěji postihuje plíce, ale může napadnout i řadu jiných orgánů a tkání. Průkaz TBC se stále opírá o mikrobiologické vyšetření a kultivaci mykobakterií. Další možností průkazu

mykobakterií jsou rychlé bezkultivační molekulárně - genetické metody. Vzhledem k tomu, že ale prokazují funkční i neživotoschopné mykobakterie, měly by být použity pouze jako doplněk ke standardně používaným laboratorním metodám. Nezbytnou součástí mikrobiologického vyšetření je i stanovení citlivosti na základní antituberkulotika (AT). V případě rezistence potom stanovení rozšířené citlivosti. Léčba tuberkulózy je kombinovaná, dlouhodobá a kontrolovaná (Kolek et al., 2014).

Téma pro svou bakalářskou práci jsem si zvolila vzhledem ke stále aktuální závažnosti onemocnění. Dalším důvodem byl i vstřícný přístup vedení Plicní léčebny Nemocnice České Budějovice, a.s. v poskytnutí potřebných dat. Na diagnostiku plicní tuberkulózy jsem se zaměřila i vzhledem k tomu, že její včasnost je nedílnou součástí úspěšného boje proti tuberkulóze. O bakteriologickém průkazu, který zůstává „zlatým standardem“ v diagnostice mykobakterií toho bylo napsáno už dost. Zaměřila jsem se proto na další metody, které se k průkazu mykobakterií využívají. Hlavní pozornost jsem věnovala vyhodnocení tuberkulinového kožního testu (PPD) a quantiferonového testu (QF). Zatímco využití PPD testu pomalu ale jistě klesá, QF test se naopak dostává do popředí, což je patrné i z grafu, který je součástí výsledků mé práce. Cílem mé práce bylo vytvořit statistický přehled pacientů s plicní tuberkulózou hospitalizovaných v Plicní léčebně Nemocnice České Budějovice, a.s. Zjistit, který z obou testů je citlivější a jaký je trend v jejich provádění. Samostatným cílem pak bylo vyhodnocení quantiferonového testu.

# 1. Základní poznatky o tuberkulóze

## 1.1 Definice tuberkulózy

Tuberkulóza (TBC) patří mezi povinně hlášené infekční onemocnění způsobené bakteriemi *Mycobacterium tuberculosis* komplex (MTC). Prakticky všechny případy tuberkulózy v ČR jsou vyvolány *M. tuberculosis*. Už pouze výjimečně je původcem onemocnění v ČR *M. bovis* a onemocnění způsobená ostatními zástupci komplexu *M. tuberculosis* (*M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canetti* a *M. pinipedii*) jsou v našich podmínkách raritou. Do kompletního výčtu všech osmi dnes známých členů tuberkulózního komplexu je nutné zahrnout i vakcinační kmen *M. bovis* BCG (Svobodová, 2013). Tuberkulóza je chronické granulomatózní onemocnění postihující člověka, savce, ptáky, ryby, obojživelníky a plazy (Greenwood et al., 1999). Onemocnění může postihnout kterýkoliv orgán, avšak plíce jsou postiženy dominantně. Histologicky se tuberkulózní léze vyznačují zánětlivými změnami s nálezem granulomů s centrální kaseifikační nekrózou. Granulomy i exsudát jsou tvořeny epiteloidními a Langhansovými buňkami. Za jednoznačný průkaz onemocnění je u nás považována pozitivní kultivace mykobakterií (Kolek et al., 2014).

## 1.2 Historie tuberkulózy

Tuberkulóza je odvěkou metlou lidstva. Sužovala jej po celou známou historii a každé historické období si prošlo svou epidemií tuberkulózy. Dá se předpokládat, že *Mycobacterium* vzniklo před více jak 150 milióny lety. Moderní metody molekulární genetiky a sekvenování genomu kmenů *M. tuberculosis* pomohly upřesnit dobu vzniku mykobakterií. Je pravděpodobné, že všechny moderní členy komplexu *M. tuberculosis* měly společného afrického předchůdce již před 15 000 - 35 000 lety. Typické kosterní abnormality tuberkulózy včetně charakteristických deformací byly nalezeny již na egyptských mumiích (Frith, © 2017).

Pod pojmem phthisis (souchotiny, úbytě) se tuberkulóza objevila v řecké literatuře. Hippokrates ji identifikoval jako nejrozšířenější onemocnění té doby končící téměř vždy fatálně. Ve středověku patřila tuberkulóza k velmi častým příčinám smrti, podrobnější patologické a anatomické popisy nemoci se začaly

objevovat v 17. století. Termín **tuberkulóza** zavedl v roce 1834 J. L. Schönlein. Významným dnem v historii tuberkulózy se stal **24. březen 1882**, kdy její etiologii objasnil **Robert Koch**, který za tento objev získal v roce 1905 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Snahou bylo zlepšení sociálních a hygienických podmínek. V Evropě a ve Spojených státech vzniklo mnoho sanatorií. První sanatorium pro pacienty nakažené tuberkulózou otevřel v roce 1854 Hermann Brehmer v Görbersdorfu. Koch v roce 1890 prohlásil, že lékem proti tuberkulóze by mohl být extrakt bacilu tuberkulózy a nazval jej „tuberkulin“. Později se ukázalo, že léčba touto látkou je neúčinná, ovšem později se uplatnila v diagnostice TBC. Kochův objev vydláždil cestu pro vývoj Pirquetova a Mantouxova tuberkulinového kožního testu (r. 1908) (Frith, © 2017).

Důležitý krok v boji proti tuberkulóze učinili pánové **Albert Calmette** a **Camille Guérin**, kteří od roku 1905 usilovně pracovali na vývoji vakcíny proti tuberkulóze. BCG vakcína (zkratka z Bacillus Calmette-Guérin) byla poprvé použita na lidech v roce 1921 ve Francii a jednalo se o oslabený kmen *Mycobacteria bovis*. Její použití se ale masově rozšířilo až po druhé světové válce. Účinná léčba tuberkulózy přišla až s vývojem streptomycinu, prvního antibiotika a baktericidního prostředku účinného proti *M. tuberculosis*, jehož účinky objasnili Albert Schatz a Selman Waksman. Isoniazid následoval v roce 1952 a rifampicin v roce 1957 (Thomas, © 2006).

### ***1.3 Etiologie tuberkulózy***

Původcem onemocnění je nejčastěji *Mycobacterium tuberculosis* objevené Robertem Kochem v roce 1882. Běžně se tak mikrob označuje zkratkou BK (bacil Kochův). Je to imobilní krátká rovná nebo lehce zahnutá aerobní nesporulující tyčinka s optimálním růstem při teplotě 37-38 °C. Ve sputu a v klinických vzorcích se nachází izolovaně nebo častěji ve shlucích. Izolaci mykobakterií umožňuje jejich acidorezistence způsobená vysokým obsahem lipidů ve ztlustělé povrchové membráně. Stejně jako ostatní mykobakteria je i *M. tuberculosis* vysoce odolné vůči vyschnutí. Velmi citlivé je k ultrafialovému záření a k zahřátí, a proto nepřežívá pasterizaci. Pro spolehlivé ničení v infekčním materiálu je nejvhodnější sterilizace v autoklávu. Z dezinfekčních prostředků jsou nejúčinnější především lyzol (1%), formaldehyd (5%) nebo chloramin (až 5%) (Votava et al., 2003).

## ***1.4 Epidemiologie tuberkulózy***

Nejzávažnějším zdrojem *M. tuberculosis* je člověk s otevřenou tuberkulózou, tedy ten, který vylučuje mykobakterie prokazatelné mikroskopicky. K přenosu dochází nejčastěji inhalační cestou, vdechnutím infekčního aerosolu při blízkém styku s nemocnými. Možným způsobem přenosu je také inokulační nákaza, tedy přenos přímým kontaktem s infekčními sekrety nemocných. Předpokládá se i možnost nákazy při kontaktu s infikovanými předměty (přibory, prádlo). Možná je i profesionální nákaza u lidí pracujících s infekčním materiálem (Kolek et al., 2014).

### ***1.4.1 Údaje uváděné Světovou zdravotnickou organizací (WHO)***

Pandemie tuberkulózy byla v roce 2015 větší, než se původně předpokládalo, což vyplývá i z údajů uváděných Světovou zdravotnickou organizací (WHO). V roce 2015 bylo odhadem zjištěno 10,4 miliónů nových TBC případů po celém světě, z čehož 5,9 miliónů (56 %) byli muži, 3,5 miliónů (34 %) byly ženy a 1,0 miliónů (10 %) byly děti. Lidé infikovaní HIV představovali 1,2 miliónů (11 %) ze všech nových případů tuberkulózy. Nicméně počet úmrtí a výskyt tuberkulózy i nadále na celém světě klesá. Šest zemí je zodpovědných za 60 % nových případů: Indie, Indonésie, Čína, Nigérie, Pákistán a Jižní Afrika. Nezbytný je proto pokrok v oblasti prevence a léčby TBC právě v těchto zemích. V roce 2015 poklesla incidence TBC celosvětově pouze o 1,5 % oproti roku 2014. Přesto, že počet úmrtí na tuberkulózu klesl mezi lety 2000 a 2015 o 22 %, stále zůstává tuberkulóza jednou z hlavních příčin úmrtí na celém světě (Global tuberculosis report, 2016).

### ***1.4.2 Tuberkulóza v České republice***

Poslední uveřejněná data výskytu tuberkulózy v České republice jsou za rok 2015. V tomto roce bylo do Registru tuberkulózy nahlášeno celkem 518 onemocnění tuberkulózou všech forem a lokalizací, tj. 4,9 případu na 100 000 obyvatel. Oproti roku 2014 se stav hlášených případů téměř nezměnil (v roce 2015 bylo o 4 případy více). Z dlouhodobého hlediska má u nás počet onemocnění TBC trvale klesající trend a v mezinárodním porovnání patříme mezi země s nízkým výskytem nemoci.

Z celkového počtu hlášených onemocnění TBC se v 391 případech (75,5 %) jednalo o definitivní případ TBC, tj. s pozitivní kultivací na *M. tuberculosis* komplex. Nejvíce nemocných tuberkulózou evidovalo, stejně jako v minulých letech, hlavní město Praha, naopak nejnižší počet nemocných vzhledem k počtu obyvatel zaznamenal Zlínský kraj.

Do registru bylo za rok 2015 nahlášeno 110 cizinců (osob narozených mimo ČR). Z celkového počtu zaznamenaných onemocnění tuberkulózou to bylo 21,2 %. Nejvíce nemocných pocházelo ze Slovenska, Rumunska, Ukrajiny a Vietnamu (Základní přehled epidemiologické situace v ČR, 2015).

### **1.5 Patogeneze**

Virulence *M. tuberculosis* spočívá v přežívání uvnitř makrofágů neimunního jedince a nikoliv v produkci toxinů. Přežívající mykobakteria jsou makrofágy přenášena z místa vstupu do oblastních mízních uzlin a odtud do krve a dalších orgánů. Imunitní odpověď na *Mycobacterium tuberculosis* probíhá jako typická reakce buněčné přecitlivělosti a klinický obraz tuberkulózy je dán paradoxním účinkem obranné reakce, jež destruuje tkáň a jinými patologickými projevy. Důsledkem této reaktivity je, že lidská tuberkulóza má primární a postprimární formu, se zcela odlišnými patologickými rysy (Greenwood et al., 1999).

#### **1.5.1 Manifestní tuberkulóza**

Manifestní tuberkulóza se rozlišuje na primární a postprimární, které se od sebe liší imunitní reakcí na střet s infekčním agens (Kolek et al., 2014).

##### **1.5.1.1 Primární tuberkulóza**

U primární tuberkulózy se jedná o první kontakt hostitele s mykobakteriální infekcí. Vstupní branou infekce jsou v naprosté většině případů plicní alveoly při inhalaci mykobakterií, které jsou poté pohlceny alveolárními makrofágy. Plicní makrofágy z části hynou, z části zanášejí mykobakterie do hilových lymfatických uzlin



(Greenwood et al., 1999; Kolek et al., 2014). Na počátku infekce mykobakteria uvnitř makrofágů obvykle přežívají a množí se, jelikož brání dozrávání fagosomů a jejich spojení s lysozomy. Část mykobakterií ale uhynie, jejich bílkoviny jsou rozštěpeny a antigenní polypeptidy se v souvislosti s molekulami MHC II. třídy dostanou na povrch makrofágů. (Votava et al., 2003). Je-li v jeho blízkosti specifická buňka T, rozezná obě složky (antigen a molekulu MHC II), aktivuje se a zahájí tím imunitní reakci. Buňky Th1 (CD4+) po styku s antigeny mykobakterií uvolňují interleukiny (IL-2, IL-12) a interferon gama (INF $\gamma$ ), které aktivují makrofágy a dále uvolňují chemokiny, které přitahují do místa vstupu monocyty a lymfocyty. Z monocytů se stávají makrofágy, které se po aktivaci z části mění na buňky epiteloidní a z části splývají v obrovské mnohjaderné buňky Langhansovy. Z ložiska se stává *granulom*. Střed granulomu může obsahovat směs nekrotické tkáně. Podle sýrovitého vzhledu a konzistence se tento jev označuje jako *kaseifikace*. Cytotoxické buňky Tc (CD8+) jsou schopny poznat a zničit infikovaný fagocyt a v něm se množící mykobakteria (Votava et al, 2003).

Primární ložisko a odpovídající infikovaná lymfatická uzlina tvoří tzv. *primární komplex*, ze kterého se infekce generalizuje, a vznikají ložiska v orgánech. Malá ložiska jsou přístupná pro makrofágy, takže mykobakteria v nich mohou být postupně zlikvidována. Větší ložiska se ale opouzdří vrstvou fibroblastů, jež vytvářejí pevnou jizvu, která později kalcifikuje. Část mykobakterií ale zůstává naživu a proces v ložisku může kdykoli začít progredovat (Votava et al., 2003). Primární plicní tuberkulóza může být provázena tzv. čistou atelektázou (ta je způsobena tlakem zvětšené uzliny na bronchus), nebo tzv. nečistou atelektázou (ta je způsobena provalením uzliny do bronchu) (Hrodek a Vavřinec, 2002).

### ***1.5.1.2 Postprimární tuberkulóza***

Postprimární tuberkulóza vzniká u osob již infikovaných. Po letech až desítkách let se buď může tuberkulózní ložisko reaktivovat (70 % případů), nebo dojde k exogenní infekci (30 % případů). Od primární tuberkulózy se liší v mnoha aspektech. K reaktivaci dochází buď spontánně, nebo v souvislosti s jiným onemocněním, případně za jiných okolností vedoucích k poklesu imunity (stáří, podvýživa, alkoholismus, infekce HIV). Nejčastěji dochází k reaktivaci v horních plicních lalocích a výsledkem je rozsáhlý tuberkulom, uvnitř něhož je silně kyselá reakce, anoxie a zcela malé množství živých

mykobakterií. Léze se zvětšuje a jeho zkapalněný obsah se může vyprázdnit do bronchu (Greenwood et al. 1999). Vzniká dutina, v níž se dobře množí mykobakteria. Ta se uvolňují do sputa, šíří se do jiných oblastí plic, po spolknutí dále do střev a při kašli se přenášejí na nového hostitele (tzv. otevřená tuberkulóza). Destrukce tkání vede k hemoptyse (vykašlávání krve), uvolňující se tumornekrotizující faktor alfa (kachektin) vyvolává typické znaky tuberkulózy – teploty a hubnutí. Dalším projevem mohou být meningitidy, pleuritidy, postižení ledvin, páteře a ostatních kostí a kloubů. Proniknou-li v tomto stádiu mykobakteria do oběhu, vznikají mnohočetné granulomy v orgánech. Tato forma, připomínající rozsypaná zrnka prosa, se označuje jako *miliární tuberkulóza* (z lat. *milium* - proso) (Votava et al., 2003).

### **1.5.2 Latentní tuberkulóza**

Latentní tuberkulóza je obvykle definována jako předpokládaná infekce *Mycobacterium tuberculosis* komplex, kdy nejsou přítomny žádné klinické příznaky ani rentgenové známky onemocnění, ale pro kterou svědčí pozitivní tuberkulinový kožní test nebo pozitivita IGRA testu (viz dále). Přesná diagnostika latentní TBC je obtížná. Zmíněné testy nerozliší jednoznačně mezi latentní a aktivní TBC a jejich interpretace u dětí a imunokompromitovaných jedinců je omezena. V rozvinutých zemích jsou pacienti s latentní infekcí rezervoárem *M. tuberculosis*, přičemž se předpokládá, že pouze asi u 5-10 % infikovaných osob vznikne během života aktivní onemocnění. Přesto detekce latentní TBC nabývá na významu při použití biologické léčby nebo u nemocných po transplantaci orgánů (Leung et al., 2011).

### **1.6 Klinický obraz**

Tuberkulóza plic může probíhat asymptomaticky, a potom je objevena až při rentgenovém vyšetření hrudníku například v rámci vyšetřování rizikových skupin, nebo je skiagram hrudníku či mykobakteriologické vyšetření sputa provedeno z jiných příčin. U většiny nemocných se ale tuberkulóza projeví svými příznaky – symptomy. Příznaky mohou být celkové nebo funkční. Tuberkulóza se projevuje nápadnou únavou, nechutenstvím, hubnutím, nočním pocením, poklesem fyzické výkonnosti a elevací teploty (Votava a Homolka, 2012).

Z funkčních příznaků je nutné uvést především kašel, který je zpočátku suchý, později produktivní. Sputum je většinou mukoidní nebo mukopurulentní, s různě závažnou hemoptýzou. Stále častěji se tuberkulóza manifestuje dušností, pleurální bolest je již vzácnějším příznakem (Votava a Homolka, 2012).

Obecně se dá říci, že ke vzniku tuberkulózy dochází častěji u diabetiků, u nemocných s jaterní cirhózou, renální insuficiencí, u alkoholiků a asociálů. Nápadný je také častý výskyt u osob s vrozeným nebo získaným imunodeficitem (AIDS).

## ***1.7 Imunitní odpověď na M. tuberculosis***

### ***1.7.1 Iniciační obranné zánětlivé reakce***

Mykobakteria jsou v alveolárním prostoru pohlcena plicními makrofágy, které následně migrují do intersticiálního prostoru, kde produkují prozánětlivé cytokiny. Ty především mění adhezní vlastnosti endotelové výstelky cévních kapilár plic, což umožní, aby na endotelovou výstelku adherovaly především monocyty a T lymfocyty, jež se následně dostávají diapedézou do intersticiálního prostoru pod vlivem chemotaktických látek, především C-C chemokinů (Flynn a Chan, 2001).

### ***1.7.2 Časná fáze obranné zánětlivé reakce***

V intersticiálním prostoru se začíná vytvářet granulom, který je v počátku tvořen akumulací makrofágových elementů, ve kterých mohou být pohlcena mykobakteria. Vznikající granulom stimuluje prostřednictvím chemokinů cílenou migraci dalších buněk, především T lymfocytů (Krejsek a Kopecký., 2004).

### ***1.7.3 Vrcholná fáze obranné zánětlivé reakce***

Zcela organizovaný granulom je tvořen makrofágy a různými populacemi T lymfocytů, nesoucími na svém povrchu jak TcR $\alpha\beta$ , tak i TcR $\gamma\delta$  receptory. Z imunoregulačních subsetů T lymfocytů výrazně převládají Th1 lymfocyty. Buněčné složky granulomu prodělávají apoptotické a nekrotické procesy, které vedou k tvorbě

kaseózního jádra. Granulom ohraničuje ložisko mykobakterií, které ale nemusí být imunitní reakcí zničeny a mohou v organismu perzistovat (Carding a Egan., 2000).

#### ***1.7.4 Pozdní fáze obranné zánětlivé reakce***

U osob s oslabenou imunitou dochází k rozpadu granulomu. Mykobakteriální infekce už není pod dozorem lokálních imunitních mechanismů a mykobakteria pronikají do alveolárních prostorů a mohou vzduchem infikovat další osoby. Mykobakteria, která jsou uvnitř buněčných složek, pronikají do cévního řečiště a šíří se krví do dalších orgánů (Krejsek a Kopecký, 2004).

### ***1.8 Diagnostika plicní tuberkulózy***

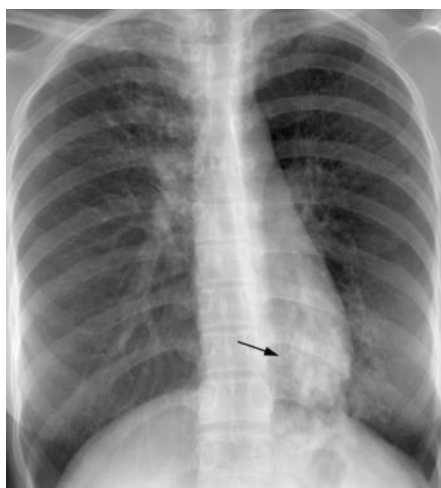
#### ***1.8.1 Fyzikální nález***

Fyzikální nález může být fyziologický nebo jsou zjištěny příznaky choroby. Důležité je posuzovat celkový stav a vzhled nemocného. Někdy jsou přítomny vedlejší jevy jako vlhké přízvučné chrůpky nad pneumonickými ložisky, při pleurálním výpotku bývá oslabené dýchání, bronchofonie bývá oslabená (Kolek et al., 2014).

#### ***1.8.2 Radiologický nález***

Skiagram hrudníku (viz obr. 1) je základním vyšetřením u plicní i mimoplicní tuberkulózy přesto, že nebývá specifický. Na rentgenu jsou vidět ložiskové a infiltrativní stíny. Změny se nejčastěji nacházejí v dorzálním a apikálním segmentu horního laloku nebo v apikálním segmentu dolního laloku, mohou být ale lokalizovány kdekoliv. Na snímcích lze pozorovat i diseminované formy tuberkulózy.

Je nutné zmínit, že nelze stanovit diagnózu tuberkulózy pouze z rtg změn. K tomu je nutná další metoda a to mykobakteriologické vyšetření sputa nebo jiného materiálu (Votava a Homolka, 2012; Krejsek a Kopecký, 2014).



Obr. 1: Skiagram hrudníku.  
Primární tuberkulóza  
(Zdroj: Catanzano, 2016)

### ***1.8.3 Laboratorní vyšetření***

Základem laboratorní diagnostiky tuberkulózy zůstávají stále přímé metody průkazu, tedy mikroskopie a kultivace. Metody se liší od rutinního bakteriologického vyšetření, proto musí být z žádanky jasné, že se jedná o průkaz BK (bacil Kochův).

#### ***1.8.3.1 Odběr materiálu***

Standardním vzorkem k průkazu plicní tuberkulózy je *sputum* odebrané opakovaně ráno nalačno před hygienou ústní dutiny nebo **indukované sputum**, které se získává od pacienta, který spontánně nevykašlává, po inhalaci solného roztoku. Dále lze vyšetřovat tekutinu získanou bronchoalveolární laváží nebo aspirát získaný z bronchu. U plicní tuberkulózy lze vyšetřovat i žaludeční šťávu. Laryngeální výtěr lze odebrat u osob, od kterých není možné získat sputum (Kolektiv autorů, 1998).

#### ***1.8.3.2 Mikroskopie***

Mikroskopický průkaz acidorezistentních tyčinek (ART) je velice cenný, a to pro svou rychlost a jednoduchost v provedení. Přesto je ale nejméně citlivou metodou (citlivost mikroskopie je asi 100krát nižší než citlivost kultivace). Je vhodnou metodou při vyhledávání osob s tuberkulózou a při kontrole účinnosti jejich léčby.

Při tomto vyšetření ale chybí možnost bližší identifikace mykobakterií a jejich životaschopnosti. Nález acidorezistentních tyčinek v preparátu musí být proto vždy potvrzen kultivací mykobakterií. Mikroskopicky pozitivní nemocný vylučuje nejméně  $10^5$  BK v 1 ml sputa, což podtrhuje epidemiologický význam, protože nemocní s mikroskopickým nálezem jsou nejzávažnějšími zdroji tuberkulózní nákazy.

Nejužívanější metody k průkazu acidorezistentních tyčinek je barvení vzorků dle metody **Ziehl-Neelsena** (preparáty se prohlíží optickým mikroskopem) a barvení **fluorochromy** (prohlížení preparátů fluorescenčním mikroskopem) (Kolektiv autorů, 1998; Votava et al., 2003)

#### ***1.8.3.2.1 Metoda barvení dle Ziehl – Neelsena***

Metoda spočívá v obarvení teplem fixovaného preparátu karbolfuchsinem (směs bazického fuchsinu a fenolu) za horka a zahřátí do výstupu par, v odbarvení kyselým alkoholem nebo kyselinou a v dobarvení kontrastním barvivem (methylenovou modří nebo malachitovou zelení) (Kolektiv autorů, 1998).

Preparát z klinického vzorku se prohlíží pečlivě při použití imerzního objektivu (zvětšení 100x). Prohlédne se asi 50 zorných polí po celé ploše preparátu, postupuje se meandrovitě ve třech podélných pruzích. Mykobakterie se jeví jako červené tyčinky na modrém nebo zeleném pozadí, štíhlé, dlouhé několik  $\mu\text{m}$ , někdy nepravidelně zbarvené, jakoby zrnité (tzv. Muchova granula).

Hodnocení nálezu:

0	ART nenalezeny
1-9	ojedinělé ART (udává se počet)
+	10 - 20 ART
++	21 – 100 ART
+++	více než 100 ART

Pozitivní preparáty se zbaví imerzního oleje ponořením do xylolu a včetně negativních preparátů se uschovávají do ukončení celého vyšetření. Objektiv mikroskopu je třeba po odečtení každého sklíčka otřít suchou gázou, aby nedošlo k náhodnému přenesení ART na další sklíčko (Bednář et al., 1996).

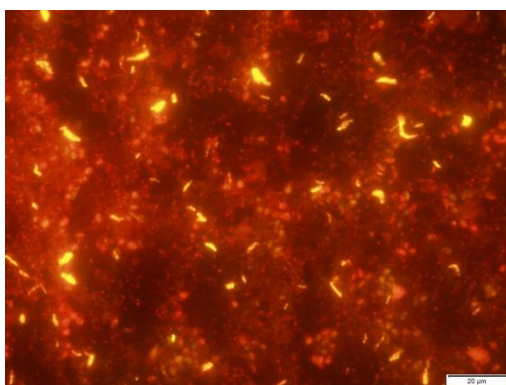
### **1.8.3.2 Fluorescenční barvení**

Fluorescenční barvení spočívá v barvení fluorochromy (*auraminem, rhodaminem*) 10 – 15 minut bez zahřívání. Následuje slití barviva a opláchnutí tekoucí vodou, odbarvení kyselým alkoholem po dobu 5 minut a dobarvení kyselým fuchsinem (manganistanem) po dobu 2 minut.

Preparát se prohlíží při celkovém zvětšení 160 – 400x, zdrojem světla je vysokotlaká UV lampa. Vyšetřuje se 25 zorných polí, přičemž preparát se prohlíží po celé ploše. Acidorezistentní tyčinky se jeví jako zářící žlutozelené až stříbřité tyčinky na temně červeném pozadí (viz obr. 2). Stejně jako u barvení dle Ziehl-Neelsena je výsledek třeba uvádět kvantitativně (Kolektiv autorů, 1998).

Hodnocení nálezu:

- 0 ART nenalezeny (nebo nalezeny 1- 4)
- + ojedinělé ART (5 – 20)
- ++ početné ART (21 – 100)
- +++ velmi početné ART (více než 100)



Obr. 2: Fluorescenční barvení - zvětšení 400 x (zdroj: vlastní)

### **1.8.3.3 Kultivace**

Materiál normálně sterilní (likvor, biopáty) lze kultivovat rovnou, ovšem sputum a ostatní klinické vzorky obsahují také jiné mikroby, které by mykobakteria rychle přerostly a půdu znehodnotily. Těto tzv. nespecifické mikroflóry je třeba se zbavit, a to dekontaminačními postupy, které využívají relativní rezistence mykobakterií ke kyselinám, louhům a některým detergentům. Rezistence je způsobená vysokým

obsahem lipidů v jejich buněčné stěně. Jedná se o tzv. **moření vzorku**. Podmínkou zpracování materiálu je dále homogenizace vzorku, které je dosaženo mechanickým třepáním a vlivem dekontaminačních činidel samých. Pomořený vzorek se zkoncentruje centrifugací a dále se vyšetřuje mikroskopicky a kultivačně (Kolektiv autorů, 1998; Votava et al., 2003).

Nejčastěji se vzorky moří hydroxidem sodným, který nejen dekontaminuje, ale zároveň napomáhá homogenizaci. Z mořících metod jsou nejběžnější například modifikovaná *Petroffova metoda* nebo *metoda s laurylsulfátem sodným* (Votava et al., 2003).

Ke kultivaci mykobakterií se používají pevné vaječné půdy (půda *Löwenstein – Jensenova*, půda *Ogawova*) a půdy tekuté (půda *Šulova*) s nativní bílkovinou – sérem. Půda *Löwenstein – Jensenova* (viz obr. 3) obsahuje kromě některých solí ještě asparagin, glycerin, škrob, vaječnou masu a malachitovou zeleň. Půda se rozplňuje po 5 ml do zkumavek a sráží se v šikmé poloze proudící párou v Arnoldově přístroji. Po správné koagulaci má ve zkumavkách zůstat trochu kondenzní vody. Správně připravená půda musí mít zrcadlově lesklý povrch a slabě zelenou barvu (viz obrázek). Půda podle *Ogawy* nevyžaduje pro svou přípravu asparagin, její příprava je velmi jednoduchá a svou citlivostí vhodně doplňuje L-J půdu. Tekutá půda *Šulova* obsahuje mimo jiné hovězí sérum. Komerčně se vyrábí koncentrát základu a před rozlíváním se ředí v poměru 1:10 (Kolektiv autorů, 1998).



Obr. 3: Löwenstein – Jensenova půda s koloniemi *M. tuberculosis* (zdroj: vlastní)

Naočkované půdy je vhodné pro každý vzorek materiálu svázat gumičkou do svazku, nutností je označení protokolárním číslem. Takto připravené naočkované půdy se inkubují při 37 °C v komorovém termostatu, kde je zajištěna cirkulace vzduchu a vhodná vlhkost.



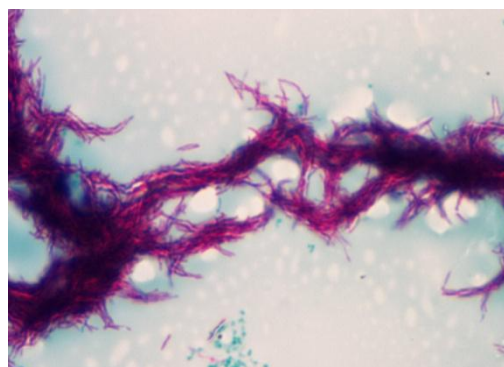
Půdy se odečítají za 3, 6 a 9 týdnů. Po prvním týdnu se vyřazují půdy kontaminované a tento výsledek se oznámí s žádostí o opakování vyšetření. Po třech týdnech se pozitivní výsledek sdělí, zachycené kmeny se začnou určovat, založí se vyšetření citlivosti a zbytek kultur se inkubuje dále. Po 6 týdnech se výsledek uzavírá a odesílají se pozitivní i negativní výsledky. Po 9 týdnech se oznamují pouze pozitivní výsledky a inkubace se ukončí (Votava et al., 2003).

Na pevných půdách vyrůstá *M. tuberculosis* v nažloutlých, drsných kvěťákovitých či bradavčitých koloniích typu *R s nepravidelným okrajem a drolivou konzistencí (eugonický růst)* (Votava et al., 2010, s. 325). V tekutých půdách může jít o růst v sedimentu (izolované neroztřepatelné kolonie) nebo v zákalu, případně v povrchové drsné, hladké nebo mukózní blance. V obou případech stačí jediná mikroskopicky ověřená kolonie a už se jedná o pozitivní nález a izolát je třeba přeočkovat, určit a stanovit jeho citlivost na antituberkulotika. Hodnocení pozitivních kultur – do 9 kolonií se tento výsledek uvádí jejich počtem, od 10 do 20 kolonií se hodnotí jedním křížkem, od 21 do 100 dvěma křížky a třemi křížky se hodnotí blanka na povrchu tekuté půdy nebo splývající růst na vaječné půdě (Votava et al., 2010).

Z novějších metod se prosadily tzv. **urychlené kultivační postupy**, založené na stanovení metabolických produktů mykobakterií při jejich růstu v tekutých kultivačních médiích. Vzorky se očkují do speciálních nádobek (viz obr. 4), kultivace probíhá v automatických analyzátoch, které dovedou už za 10 až 14 dní rozpoznat pozitivní nárůst a ihned ho ohlásit. Z pozitivní lahvičky se zhotoví preparát (obarvení dle Ziehl – Neelsena (viz obr. 5)), který objasní, zda se jedná o ART nebo o kontaminaci (Votava et al., 2003).



Obr. 4: Speciální kultivační lahvičky (zdroj: vlastní)



Obr. 5: Barvení dle Ziehl – Neelsena - typická tvorba provazců pro *M. tuberculosis* (zvětšeno 1000x) (zdroj: vlastní)

#### 1.8.3.4 Molekulárně genetické techniky

Základem těchto metod je přímý průkaz DNA mykobakterií ve vzorcích biologického materiálu. Metody jsou velmi senzitivní a specifické, prokazují genetický materiál druhů komplexu *M. tuberculosis*, případně jiné druhy rodu *Mycobacterium*. Metody se využívají také při identifikaci kmenů (Kolek et al., 2014).

Pozitivní nález je varovným signálem možné infekce, ale může se jednat i o mrtvá mykobakteria nebo o jejich fragmenty (Čermák a Havelková, 2010).

Nejčastěji využívané metody:

- **Metoda PCR**

PCR (Polymerase Chain Reaction) je metoda, která umožňuje amplifikaci specifického úseku DNA s následnou detekcí amplifikovaného vzorku. Vlastní reakce probíhá v termocyklerech, kde dochází k automatickému střídání 3 fází reakce (denaturace DNA, vazba specifických primerů a extenze). Následuje vizualizace amplikonů pomocí interkalačního činidla (ethidium bromid, SYBRGREEN,...) v agarózovém gelu metodou elektroforéza (Kolektiv autorů, 1998).

- **Metoda LCR**

LCR (Ligase Chain Reaction) – ligázová řetězová reakce je metoda, která obdobně jako PCR používá k průkazu dvouřetězcové DNA. Jedná se o typ reakce s amplifikací sondy. *Na každý úsek z obou denaturovaných řetězců DNA se váže jedna dvojice sond překrývající celý hledaný úsek, které posléze spojuje ligáza* (Kolektiv autorů, 1998, s. 15). Spontánnímu přiblížení všech 4 sond a jejich svázání ligázou, což by vedlo k falešné pozitivitě, zabraňuje mezera „gap“ ponechaná mezi dvojicí sond. Detekce amplifikovaného produktu může být fluorescenční nebo v agarózovém gelu metodou elektroforéza.

Molekulárně genetické techniky jsou rychlé metody, výsledek je znám ještě tentýž den a celé vyšetření trvá 6 – 8 hodin. Metody musí být vždy paralelně doplněny mikroskopickým a kultivačním vyšetřením (Kolektiv autorů, 1998).

### 1.8.3.5 Vyšetřování citlivosti

Test lékové citlivosti na hlavní antituberkulotika (AT), tedy na isoniazid (INH), rifampicin (RMP), pyrazinamid (PZA), ethambutol (EMB) a streptomycin (STM), se provádí u každého nově izolovaného kmene *M. tuberculosis*. V případě zjištěné rezistence u dříve již léčených pacientů nebo podle dohody s ošetřujícím lékařem se stanovuje rozšířená citlivost (Votava et al., 2010).

Stanovení citlivosti se provádí tzv. proporčním testem podle Canettiho na kultivačních půdách obsahujících antituberkulotikum. Před zařazením kmenů do testu se zkontroluje kvalita i kvantita růstu, do testu je možné zařadit pouze dobře narostlé kultury bez kontaminace. Na půdy se očkuje množství 0,1 ml na 1 zkumavku, a to z ředění, v nichž je možné očekávat růst v počitatelných koloniích. Naočkované inokulum se musí nechat dobře zaschnout. Proto se musí zkumavky prvních 24 hodin inkubovat ve vodorovné poloze. Poté je možné inkubovat vertikálně při 37 °C. Obvyklá doba inkubace jsou 3 týdny. U kmenů, které po uplynutí této doby nemají dostatečně vyrostlé kontroly (počitatelné kolonie), se prodlužuje inkubace o další 1-2 týdny. Izolované kolonie, vyrostlé v nejvyšším ředění inokula na kontrolních půdách, je nutné spočítat co nejpresněji na obou paralelních zkumavkách. Jejich aritmetický průměr umožňuje stanovit počet živých mykobakteriálních jednotek - colony forming units (CFU) v každém ředění inokula i v jeho základě. Přesně se spočítá i počet kolonií, které vyrostly na půdě s antituberkulotiky. Výpočet procenta rezistentních zárodků se provádí podle vzorce:

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

kde a = počet kolonií vyrostlých na půdě s kritickou koncentrací léku

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

**Kritická proporce (x %) rezistentních zárodků je 1 %.** V případě, že je x % menší než 1 nebo se rovná 1, hodnotí se kmen jako „citlivý“. V případě, že je x % větší než 1, hodnotí se kmen jako „rezistentní“. Při odečítání vyšetřovaných kmenů se hodnotí jako první kmeny kontrolní. Kontrolu představuje kmen *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, který je na kritické koncentrace léků citlivý. Dobré je přidat ke každé sérii i „divoké“ kmeny *M. tuberculosis*, tzn. čerstvěji izolované od nemocných se známou, opakovatelně ověřenou citlivostí, resp. rezistencí na léky. Výsledek testu citlivosti se hlásí do ISBT (Kolektiv autorů, 1998; Votava et al., 2010).

Rozšířená citlivost se provádí v NRL (Národní referenční laboratoři) v Praze, a to v případě zájmu, nebo při rezistenci kmene. NRL provádí citlivost na další antituberkulotika – PAS – p-aminosalicylovou kyselinu, cykloserin, etionamid, kanamycin, amikacin, rifabutin, ciprofloxacin, ofloxacin, azitromycin, claritromycin.

#### **1.8.3.6 IGRA (*interferon gamma release assay*) testy**

Jedná se o krevní testy, které napomáhají při diagnostice *M. tuberculosis*. Testy detekují indukci tvorby interferonu ( $\text{INF}\gamma$ ) v krvi nemocných. Senzibilizované T-lymfocyty produkují  $\text{INF}\gamma$  po styku se specifickými antigeny obsaženými v detekčním systému testu. Nejčastěji používaným testem je Quantiferon-TB-Gold test. Podobným testem je T-SPOT.TB Testy umožňují diagnostikovat i latentní infekci. (Kolek et al., 2014).

##### **1.8.3.6.1 Quantiferon – TB - Gold test**

Jedná se o test  $\text{INF}\gamma$  z plné krve měřící odpovědi na peptidové antigeny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4). Slouží pro diagnostické účely in vitro. Detekce  $\text{INF}\gamma$  pomocí ELISA testu se používá ke zjištění in vitro reakcí na zmíněné peptidové antigeny, které souvisí s infekcí *Mycobacterium tuberculosis*. Jedná se o nepřímý test infekce *M. tuberculosis* a musí být vždy doplněn o výsledky přímého mikroskopického a kulturačního vyšetření. Podrobněji bude popsán v metodické části práce (Votava a Homolka, 2012).

##### **1.8.3.6.2 T – SPOT TB test**

Obdoba testu *Quantiferon – TB – Gold test*. Taktéž pracuje se specifickými antigeny ESAT-6 a CFP-10, které v případě infekce *M. tuberculosis* stimulují Th1 lymfocyty, které poté produkují  $\text{INF}\gamma$ . Ten je zachycen monoklonální protilátkou navázanou na dno kultivační jamky a v dalším kroku je detekován imunochemicky protilátkou označenou enzymem, který štěpí substrát za vzniku barevného produktu. Výsledkem je barevný spot na dně kultivační jamky, který odpovídá jedné buňce produkující interferon  $\gamma$  (Meyer et al., 2005).

Test je určen k identifikaci nemocných s latentní tuberkulózou a používá se jako výběrový test u pacientů, u kterých byl výsledek průkazu latentní infekce testem *Quantiferon* neurčitý.

#### ***1.8.4 Sérodiagnostika***

Jedná se o nepřímý průkaz tuberkulózy. Serologické testy jsou obvykle založeny na detekci protilátek (třídy IgM, IgG a IgA) hostitele proti složkám mykobakterií. Nejvhodnější je využívat komerčně dostupné soupravy, jejichž předností je zejména kvalita použitých antigenů.

Jelikož se jedná pouze o pomocnou diagnostickou metodu, nedá se na jejím základě stanovit diagnóza tuberkulózy nebo mykobakterií. Senzitivita i specifita této metody jsou velmi nízké, praktické použití je proto diskutabilní. Přesto se výsledek stanovení sérových specifických protilátek může stát jedním z komplexních diagnostických kritérií, která společně s výsledky dalších testů vedou k určení etiologie onemocnění (Kolektiv autorů, 1998; Kolek et al., 2014).

#### ***1.8.5 Tuberkulinový kožní test***

Mantoux test nebo tuberkulinový kožní test (TST) nebo také Purified Protein Derivate (PPD) test je globálně používanou metodou. Test spočívá v intradermální aplikaci 0,1 ml tuberkulinu. Biologická účinnost tuberkulinu se stanoví podle mezinárodního standardu a vyjadřuje se v mezinárodních jednotkách (m.j.). Použitelnost testu je omezena, neboť nerozlišuje mezi aktivním a neaktivním onemocněním a stavem po očkování BCG. V našich podmínkách očkované populace a značné promořenosti ve vyšším věku nemá pro stanovení zásadní význam. Podrobněji bude tuberkulinový kožní test popsán v metodice této práce (Vroblová et al., 2009).

### ***1.9 Léčba tuberkulózy***

Léčba plicní i mimoplicní tuberkulózy má svá pravidla a v obou případech spočívá v kontrolovaném podávání, (tj. pod dohledem), kombinací několika antituberkulotik (AT). S jejich nástupem tak téměř vymizela chirurgická léčba aktivní tuberkulózy.

Cíle léčby tuberkulózy jsou:

- vyléčit nemocného s tuberkulózou a zachovat kvalitu života a produktivitu
- zabránit úmrtí na aktivní tuberkulózu a předejít pozdním následkům
- zabránit relapsu onemocnění
- minimalizovat možnosti přenosu TBC na jiné osoby
- zabránit vzniku získané lékové rezistence

### 1.9.1 Antituberkulotika

Léčba antituberkulotiky je kombinovaná, dlouhodobá a plně kontrolovaná. Právě plně kontrolované léčebné režimy označované DOTS (*directly observed therapy, short-course*) se ukázaly jako nejúčinnější.

Základními antituberkulotiky jsou *isoniazid* (hydrazin kyseliny isonikotinové, INH, H), *rifampicin* (RMP, R), *pyrazinamid* (PZA, Z), *ethambutol* (EMB, E) a *streptomycin* (STM, S) (Kolek et al., 2014). Jejich základní charakteristiky jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1: Charakteristika základních antituberkulotik a jejich dávkování

<b>Isoniazid (hydrazin kyseliny isonikotinové, INH, H)</b> – inhibuje výstavbu buněčné stěny zásahem do syntézy kyseliny mykolové. Rychle a dobře se resorbuje, 80-96 % se acetylací metabolizuje v játrech, rychlost acetylace je určena geneticky. Podává se v denní dávce 5 mg/kg per os, max. 300 mg, intermitentně 10 mg/kg, max. 900 mg. Mezi nežádoucí účinky patří hepatotoxicita, neurotoxicita (periferní neuritida), alergie. Při podávání je nutná suplementace pyridoxinem.
<b>Rifampicin (RMP, R)</b> – baktericidní antibiotikum na rychle i pomalu se množící mykobakterie. Z 60-80 % je navázán na proteiny, prodělavá enterohepatální cyklus, je metabolizován desacetylací a vylučován z 90 % do žluči a z 10 % do moči. Barví do oranžova sliny, pot, moč. Denní dávka je 10 mg/kg per os (max. 600 mg denně na lačno, 450 mg u hmotnosti pod 50 kg), intermitentní dávkování je stejné. Z vedlejších účinků jsou popisovány zažívací potíže, poškození ledvin, trombocytopenie, chřipkové obtíže (flu-like syndrome). Pozornost je třeba věnovat četným lékovým interakcím.
<b>Pyrazinamid (PZA, Z)</b> – působí baktericidně na intracelulárně fagocytované a rychle rostoucí mykobakterie. Denní dávka je 25 mg/kg per os, zpravidla 2 g per os denně. Je hepatotoxický, snižuje tubulární sekreci kyseliny močové, proto vyvolává hyperurikémii, výjimečně i příznaky dny.
<b>Ethambutol (EMB, E)</b> – synteticky připravené AT s mykobakteriostatickým účinkem. Podávání v denní dávce 15 mg/kg per os (rozmezí 15-20), intermitentně se podává 3x týdně v dávkách 30 mg/kg. Závažným vedlejším účinkem je retrobulbární neuritida s poruchami vidění a barvocitu.
<b>Streptomycin (STM, S)</b> – působí baktericidně na extracelulárně uložené mykobakterie. Obvyklá dávka při denním i intermitentním léčebném režimu je 1 g i.m., u starších osob nad 60 let a při hmotnosti pod 45 kg 0,75 g i.m. Je ototoxický, neurotoxický, může vyvolat kožní alergické reakce.

Zdroj: Votava a Homolka, 2012

Celková doba léčby se odvíjí od rozsahu onemocnění, průkazu mykobakterií, předchozí léčbě a použitých lécích. Léčba je rozdělena na fázi iniciální – ústavní léčbu, která trvá minimálně 2 měsíce a vede k debacilizaci, snížení mykobakteriální populace. Podává se kombinace čtyř až pěti antituberkulotik. Obvykle je realizována za hospitalizace. Další léčba – pokračovací fáze trvá minimálně 4 až 5 měsíců a podává se dvojkombinace (u dříve léčených trojkombinace) antituberkulotik ambulantně. Léčbu je vhodné podávat denně. Intermitentně – 3x týdně je možné podávat léčbu v pokračovací fázi u nových TBC pacientů, u kterých je léčba přímo kontrolovaná (DOTS).

Pokud nelze sestavit vhodný léčebný režim z pěti hlavních antituberkulotik, přistupuje se k podávání antituberkulotik rezervních. Mezi ně se řadí *ethionamid*, *prothionamid*, *cykloserin*, *kanamycin*, *amikacin*, *capreomycin*, *thiacetazon*. Rezervní AT jsou méně účinná než základní léky a používají se zpravidla u rezistentních forem tuberkulózy (Votava a Homolka, 2012; Kolek et al., 2014).

### ***1.9.2 Léčebné režimy***

Standardizovaná léčba spočívá v léčbě všech pacientů v definované skupině stejným léčebným režimem. Pro přidělení standardního režimu platí stejné kategorie jako pro registraci a hlášení případů, které rozlišují nového pacienta od již dříve léčených. *Registrační skupiny nemocných s předchozí léčbou jsou založeny na výsledku předchozí léčby: selhání léčby, relaps nebo léčba po přerušení* (Kolek et al., 2014, s. 236) (viz Příloha 1 a 2).

### ***1.9.3 Rezistentní formy tuberkulózy***

#### **Multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB)**

MDR-TB představuje závažný medicínský problém, který vzniká hlavně v důsledku špatného dodržování léčby. Nevhodné nebo nesprávné užívání antimikrobiálních léků nebo používání neúčinné lékové formy (např. užívání jediného nebo nekvalitního léku) nebo předčasné přerušení léčby může způsobit rezistenci. V některých zemích je léčba MDR-TB stále obtížnější. Možnosti léčby jsou omezené a drahé, doporučené léky nejsou vždy k dispozici a pacienti často pocítují řadu

nežádoucích účinků (Tuberculosis – Fact sheets, 2017). **Multirezistence** je definována jako rezistence mykobakterií vůči **isoniazidu** a **rifampicinu**, dvěma nejúčinnějším antituberkulotikům (Votava a Homolka, 2012).

Lékové rezistence lze zjistit pomocí speciálních laboratorních testů, které testují citlivost mykobakterií na léky. Testy mohou pracovat na molekulárním principu (např. Xpert MTB/RIF) nebo na základě kultivace. Výhodou molekulárních technik je, že jsou schopny poskytnout výsledky během několika hodin. WHO doporučila zrychlit detekci a zlepšit výsledky léčby MDR-TB prostřednictvím nových, rychlých diagnostických testů a kratšími a levnějšími léčebnými režimy. Za méně než 1000 dolarů na pacienta lze dokončit nový léčebný režim za 9-12 měsíců (Tuberculosis – Fact sheets, 2017).

Pro kontrolu lékově rezistentních forem tuberkulózy je důležité začít léčit pacienta co nejdříve, poskytnout pacientům přístup k diagnostice, zajistit adekvátní ochranu proti infekci v zařízeních, kde jsou pacienti léčeni a zajistit vhodné využívání doporučených léků druhé volby.

### **Extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TB)**

XDR-TB je vážnější forma multirezistentní tuberkulózy, kdy mykobakteriální kmen není citlivý na rifampicin a isoniazid, a dále minimálně na jeden injekční lék z druhé řady antituberkulotik (amikacin, capreomycin, kanamycin) a jedno fluorochinolonové AT. Léčba těchto pacientů je mnohem nákladnější než léčba pacientů s MDR-TB. Navíc u těchto pacientů nelze použít zkrácený léčebný režim (9-12 měsíců). Je zapotřebí zvolit delší léčebný režim, u kterého lze použít jeden z nových léků (bedaquilin, delamanid) (Votava a Homolka, 2012).

V roce 2015 se přibližně u 480 000 lidí na celém světě vyvinula multirezistentní forma TBC (MDR-TB). Kromě toho se asi u 100 000 lidí vyvinula rezistence vůči rifampicinu. Zátěž do značné míry připadá na tři země – Čínu, Indii a Rusko, které dohromady tvoří téměř polovinu všech případů. Odhaduje se, že asi 9,5 % ze všech případů připadá na XDR-TB.

Po celém světě je v současné době úspěšně léčeno pouze 52 % pacientů s MDR-TB a 28 % pacientů s XDR-TB (Global tuberculosis report, 2016).



## **1.10 Prevence**

K zabránění vzniku onemocnění se provádí tři základní preventivní opatření:

1. očkování BCG vakcínou
2. izolace zdrojů
3. chemoprophylaxe

Povinná plošná kalmetizace novorozenců BCG vakcínou byla zrušena ke dni **1. 11. 2010** vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 299/2010 Sb. Provádí se pouze očkování rizikových skupin, které jsou ve vyhlášce definovány. U dítěte z rizikové skupiny je vhodné očkovat co nejdříve po narození. Do rizikové skupiny dětí patří: dítě z domácnosti, ve které někdo má nebo měl aktivní TBC; dítě, které přišlo do kontaktu s nemocným TBC; dítě v domácnosti, kde žije někdo, kdo pobýval více než 3 měsíce ve státě s výskytem TBC vyšším než 40 / 100 000 obyvatel nebo dítě, které se v takovém státě narodilo (Kolek et al., 2014; MZCR, 2012).

U nerizikových skupin je možné provést kalmetizaci na žádost rodičů většinou ve věku šesti měsíců na základě negativní tuberkulinové zkoušky. Veškeré revakcinace proti tuberkulóze u dětí byly zrušeny vyhláškou č. 65/2009 Sb. Česká republika se tak připojila k zemím s nízkou incidencí TBC, které akceptují doporučení WHO, udávající, že plošná BCG vakcinace je vhodná pouze pro země s vysokou incidencí tuberkulózy (MZCR, 2012).

### **1.10.1 BCG vakcinace**

Historie BCG vakcíny (Bacillus Calmette-Guérin) sahá do 20. let minulého století, kdy byla vyvinuta **Albertem Calmettem** a **Camillem Guérinem**, a sice pasážíváním *M. bovis* v nepříznivých podmínkách, což virulenci kmene natolik oslabilo, že ho bylo možno použít jako očkovací látku. Originální kmen, izolovaný z vemene tuberkulózní krávy, se bohužel nezachoval a další pasáže byly příčinou toho, že dnes existuje několik odlišných kmenů BCG vakcíny. U lidí byla poprvé použita v roce 1921 ve Francii a jedná se pravděpodobně o nejpoužívanější vakcínu v historii lidstva. Vakcína se od roku 1961 podává lyofilizovaná (Votava et al., 2003).

V současné době se používá lyofilizovaná vakcína (BCG vaccine SSI) připravená z dánského kmene 1331, která obsahuje  $\geq 2,0 \times 10^6 \leq 8,0 \times 10^6$  CFU (živých zárodků) v 0,75 mg. Aplikuje se 0,05 ml rozpuštěné vakcíny intradermálně nad spodní úpon

deltového svalu. Očkování lze provést nejdříve čtvrtý den po narození dítěte. Novorozenci a kojenci mladší šesti týdnů mohou být očkováni bez předchozí tuberkulinové zkoušky. Kojenci od šesti týdnů věku výše by neměli být očkováni bez předchozího provedení tuberkulinové zkoušky. Přeočkování proti tuberkulóze WHO nedoporučuje provádět (Leták BCG vaccine SSI, 2009).

Po intradermální aplikaci vakcíny se v místě vpichu objevuje lokální zánětlivá reakce. Oslabené BCG mykobakterie putují do regionálních mízních uzlin a dále do celého těla. Po krátkém čase jsou zničeny imunitním systémem.

Častou reakcí na úspěšné očkování je indurace v místě vpichu injekce, která může během několika dnů ulcerovat. Tato léze se obvykle spontánně hojí a zanechává po sobě povrchovou jizvu 2-10 mm v průměru u všech očkovaných osob. Mezi vzácnější nežádoucí účinky patří generalizovaná lymfadenitida s možnou fluktuací až tvorbou píštělí, osteitida, uveitida nebo i meningitida. Nejzávažnější je generalizovaná infekce BCG kmenem, tzv. *BCG-itida* (Kolek et al., 2014).

### ***1.10.2 Chemoprophylaxe***

Preventivní podávání antituberkulotik (chemoprophylaxe) se uplatňuje u jedinců, kteří jsou ve zvýšeném riziku nákazy tuberkulózou. Nejčastěji se provádí monoterapií isoniazidem (300 mg/den) po dobu 6 měsíců (Greenwood et al., 1999). Chemoprophylaxe se rozděluje na **primární** – slouží k ochraně osob neinfikovaných, ale exponovaných nákaze a na **sekundární** – slouží u osob již infikovaných k zabránění přechodu infekce do manifestního onemocnění (Votava a Homolka, 2012).

Vždy je nutné zvážit riziko poškození jater vůči riziku vzniku manifestní tuberkulózy. Léčba se nepřerušuje, nedosáhnou-li výsledky jaterních testů dvojnásobku normálních hodnot.

### ***1.11 Povinné hlášení tuberkulózy***

V České republice se povinnost hlášení vztahuje na každé nově zjištěné onemocnění tuberkulózou nebo mykobakteriózou, na recidivu jakož i na úmrtí na tuberkulózu nebo mykobakteriózu. Údaje o všech oznámených výskytech

se monitorují v centrálním registru TBC. Hlášení tuberkulózy podává lékař (pracoviště), který aktivní TBC zjistil (Votava a Homolka, 2012).

### ***1.11.1 Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR - ÚZIS***

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (dále jen ÚZIS) byl založen v roce 1960. Je organizační složkou státu a jeho zřizovatelem je Ministerstvo zdravotnictví ČR. Je také správcem Národního zdravotnického informačního systému (NZIS) podle zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování v platném znění (Základní informace o ÚZIS ČR, 2017).

NZIS je jednotný celostátní informační systém veřejné správy zpracovávající osobní a další údaje ze základních orgánů veřejné správy, ministerstev, od poskytovatelů zdravotních služeb, případně dalších osob předávajících údaje do NZIS (Základní informace o ÚZIS ČR, 2017).

Ústav je součástí státní statistické služby a tuto činnost vykonává v souladu se zákonem č. 89/1995 Sb., o státní statistické službě, ve znění pozdějších předpisů. Spolupracuje s orgány státní statistické služby, především s Českým statistickým úřadem, zajišťuje vazby mezi NZIS a jednotlivými poskytovateli zdravotních služeb (Základní informace o ÚZIS ČR, 2017).

Ústav se řídí principy, obsaženými v tzv. Kodexu evropské statistiky, jehož cílem je zajištění kvality a důvěryhodnosti evropských dat.

Ústav spolupracuje s asociacemi nemocnic, sdruženími lékařů, odbornými lékařskými společnostmi, zdravotními pojišťovnami a dalšími organizacemi. Na mezinárodní úrovni se jedná o spolupráci zejména s organizacemi WHO, OECD, OSN, EUROSTAT a dalšími. ÚZIS je překladačem oficiálních informací z NZIS za Českou republiku (Základní informace o ÚZIS ČR, 2017).

### ***1.11.2 Registr tuberkulózy (RTBC)***

Účelem zjišťování požadovaných údajů je zajištění dohledu nad tuberkulózou v České republice a příprava programů k omezení jejího výskytu.

Registr sleduje všechny osoby, u kterých byla na území České republiky zjištěna aktivní tuberkulóza nebo jiná mykobakteriόza a osoby dispenzarizované ve skupinách aktivní i inaktivní tuberkulózy nebo jiné mykobakteriόzy.

RTBC je od roku 2003 součástí Informačního systému orgánů ochrany veřejného zdraví a je provozován jako webová aplikace s centrální databází. Vkládání dat je zajištěno prostřednictvím internetového připojení a vše je pečlivě zabezpečeno.

Součástí RTBC se stala také databáze Informačního systému bacilární tuberkulózy (ISBT). ISBT je systém pro hlášení pozitivních výsledků mykobakteriologických vyšetření. Každá laboratoř, která provádí detekci TBC, je povinna hlásit pozitivní nálezy. Spolupráce RTBC a ISBT přispívá ke kontrole úplnosti a validity dat o TBC (Registr tuberkulózy, 2017).

## **2. Cíl práce a hypotézy**

### ***2.1 Cíle práce***

1. Distribuce pacientů s plicní tuberkulózou dle věku a pohlaví ve vzorku populace za období 2008 – 2016.
2. Porovnání tuberkulinového kožního a quantiferonového testu u pacientů s plicní tuberkulózou za období 2008 – 2016.
3. Realizace a vyhodnocení výsledků quantiferonového testu u pacientů za rok 2016.

### ***2.2 Hypotézy***

1. Předpokládám, že výskyt plicní tuberkulózy bude potvrzen spíše ve vyšších věkových kategoriích.
2. Mou hypotézou je, že výskyt plicní tuberkulózy bude stejný u obou pohlaví.
3. Domnívám se, že quantiferonový test bude citlivější než tuberkulinový kožní test.
4. Mým předpokladem je, že všichni pacienti s pozitivním quantiferonovým testem budou vyšetřeni bakteriologicky.

### 3. Metodika

Metodika spočívala především ve sběru dat a jejich následném vyhodnocení. Data byla získána z Plicní léčebny Nemocnice České Budějovice, a.s., která hospitalizuje především pacienty z Jihočeského kraje a také z Vysočiny. Veškeré záznamy prováděl ošetřující personál. Pro vyhodnocení quantiferonového testu byla použita data z Pracoviště imunologie Nemocnice České Budějovice, a.s. Součástí metodiky bylo i samotné provedení QF testu.

#### 3.1 Tuberkulinový kožní test

Infekci *M. tuberculosis* eliminuje více než 90 % infikovaných osob prostřednictvím alveolárních makrofágů a buňkami zprostředkované buněčné imunity. Onemocnění se tedy klinicky neprojeví a jedinou známkou expozice *M. tuberculosis* je pozitivita tuberkulinového kožního testu. Zhruba u 5 % infikovaných jedinců se po uplynutí několika týdnů až měsíců projeví příznaky primární TBC (Krejsek a Kopecký, 2004).

Experimentálně injikované usmrcené mykobakterie nebo extrakt připravený z mykobakterií způsobuje v infikovaných zvířatech výraznou zánětlivou reakci v místě aplikace. Robert Koch, který o tomto objevu referoval, předpokládal, že by tímto způsobem mohla být tuberkulóza léčena. Nestalo se tak, ale popsaná reakce se stala důležitým diagnostickým testem (Votava a Homolka, 2012).

Aplikace původního Kochova extraktu (*tuberculinum vetus*) byla doprovázena velmi závažnými negativními vedlejšími účinky, tudíž použití v klinické praxi bylo prakticky nemožné. Z toho důvodu byl původní extrakt dále purifikován a bylo prokázáno, že nejúčinnější složkou je bílkovinná frakce označovaná jako purifikovaný proteinový derivát (PPD) tuberkulinu. Preparát PPD bylo možné standardizovat a vyrábět ve velkém množství (Krejsek a Kopecký, 2004).

Při provádění kožního testu označovaného také jako Mantoux test, se aplikuje intradermálně 0,1 ml roztoku PPD jehlou na předloktí. Kožní reakce je vyhodnocována po 48 až 72 hodinách. Pozitivní reakce se projeví v místě vpichu indurací. Měří se průměr indurace transversálně k dlouhé ose předloktí. Samotné provedení testu a jeho následné vyhodnocení je náročné na pečlivost a vyžaduje rozsáhlé zkušenosti (Brock et al., 2004).

*Kožní reakce po intradermální aplikaci PPD, která se objeví po 48 hodinách, je opožděnou buněčnou reakcí. Mikroskopicky je možné v místě indurace vidět edém a výraznou infiltraci dermis mononukleárními buňkami* (Krejsek a Kopecký, 2004, s. 511). Může dojít také k časně reakci, která se projevuje do 20 minut po aplikaci jako kopřivka. Tato reakce je pravděpodobně způsobena polysacharidy obsaženými v preparátu PPD. Do 24 hodin po aplikaci může nastat reakce Arthusova typu, která postupně vymizí a je nahrazena reakcí opožděné hypersenzitivity. Ta se projeví 2 až 12 týdnů po infekci *M. tuberculosis*. Opakovaná aplikace Mantoux testu nevyvolá u skutečně negativních jedinců pozitivní reakci (Kuo et al., 2010).

Nevýhodou testu je skutečnost, že i nepatogenní mykobakterie vnějšího prostředí nebo podmíněně patogenní mykobakterie svým antigenním účinkem indukují v člověku zkříženou imunitní reaktivitu, která se při provedení testu projeví. V evropských podmínkách a také v naší republice je výpovědní hodnota Mantoux testu prakticky znemožněna plošnou vakcinací celé populace vakcínou BCG. Na rozdíl od USA, kde je tento test velice užitečný, jelikož aktivní imunizace vakcínou BCG se zde povinně neprovádí. Osoby, které byly imunizovány vakcínou, mají kožní reakce po aplikaci PPD v širokém rozmezí velikosti indurace. Část populace nevykazuje kožní reaktivitu, část má průměr indurace větší než 15 mm. V našich podmínkách mělo provedení Mantoux testu největší význam v testování osob před aplikací BCG vakcíny.

Test pouze informuje o přítomnosti opožděné kožní reakce IV. typu, která vypovídá o předchozí expozici patogenním nebo environmentálním mykobakteriím (Nayak a Acharjya, 2012).

### **3.1.1 Hodnocení testu**

Test musí být vyhodnocen do 48 – 72 hodin po aplikaci tuberkulinu. Po uplynutí 72 hodin je test neplatný a v případě nedostavení se na kontrolu, je nutné test opakovat. Je žádoucí, aby vyhodnocování testu prováděla stejná osoba, jejíž subjektivní odchylky se stávají standardními.

Po intradermální aplikaci tuberkulinu se hodnotí vytvoření infiltrátu v místě vpichu (viz obr. 6). Pouhý erytém kolem vpichu se nehodnotí jako reakce pozitivní. Rozměr infiltrátu se hodnotí hmatem, měří se příčný průměr infiltrátu. Prsty se najde zatvrdnutí.

Je to tvrdé, pevné a ohraničené místo. Velikost se měří v milimetrech (Nayak a Acharjya, 2012).

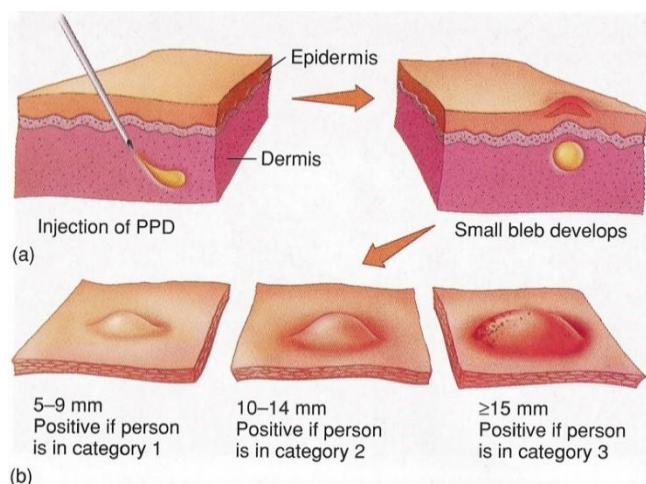
Zatvrdnutí o velikosti 5 mm nebo více, se hodnotí jako pozitivní u osob ve vysoce rizikové skupině (tzn. osoby s HIV, osoby s transplantovanými orgány, osoby užívající z různých důvodů imunosupresiva, osoby, které jsou v přímém kontaktu s jinou osobou pozitivní na TB, osoby s RTG hrudníku potvrzující zhojenou TB, osoby s konečným stádiem renálních onemocnění) (TB Elimination, 2011; Nayak a Acharjya, 2012).

Zatvrdnutí o velikosti 10 mm a více se hodnotí jako pozitivní u osob ve středně rizikové skupině (tzn. osoby, které se v poslední době přistěhovali ze země s rozšířenou TB, osoby užívající injekčně drogy, osoby pracující ve zdravotnických zařízeních, věznicích apod., děti do 4 let věku) (TB Elimination, 2011; Nayak a Acharjya, 2012).

Zatvrdnutí o velikosti 15 mm a více je vyhodnoceno jako pozitivní u všech ostatních osob, které nejsou ve vysoce nebo středně rizikové skupině. Test je považován jako pozitivní i v případě, že otok je malý, ale jsou přítomny puchýře (TB Elimination, 2011; Nayak a Acharjya, 2012).

Test je negativní v případě, že nelze nahmatat zatvrdnutí. I v případě, že je místo lehce opuchlé a zarudlé, je test považován za negativní. Test může být ale falešně pozitivní i falešně negativní, proto je důležité v případě nejasného výsledku nebo jakýchkoliv pochybností podstoupit další doporučená vyšetření (Nayak a Acharjya, 2012).

Ve své práci jsem do pozitivních výsledků PPD testu zařadila všechny pacienty s výsledkem testu 5 mm a více.



Obr. 6: Hodnocení PPD testu

(zdroj: [www.newhealthadvisor.com](http://www.newhealthadvisor.com))



### 3.2 *QuantiFERON – TB Gold In – Tube (IT) test*

#### 3.2.1 *Použití testu*

Jedná se o diagnostický test *in vitro*, který ke stimulaci buněk v heparinizované plné krvi využívá směs peptidů simulujících ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4). Odezva na tyto peptidové antigeny spojované s infekcí *Mycobacterium tuberculosis* spočívá v detekci interferonu- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) enzymovou imunoanalýzou (ELISA) (Vroblová et al., 2009).

#### 3.2.2 *Princip testu*

Test QuantiFERON – TB Gold IT hodnotí odezvu buňkami zprostředkované imunity (Cell Mediated Immunity – CMI) na peptidové antigeny, které simulují mykobakteriální proteiny. Tyto proteiny (ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4)) chybí ve všech kmenech BCG a ve většině netuberkulózních bakterií vyjma *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. flavescens* a *M. gastri*. Lidé infikovaní *M. tuberculosis* komplex mají obvykle ve své krvi lymfocyty, které tyto a další mykobakteriální antigeny rozpoznají. Součástí procesu rozpoznání je tvorba a sekrece cytokinu INF- $\gamma$ , jehož detekce a následná kvantifikace je základem tohoto testu (Powell et al., 2011).

Odezvu INF- $\gamma$  mohou potenciálně snížit léky nebo onemocnění porušující funkci imunitního systému. Vůči používaným antigenům mohou také reagovat pacienti s některými jinými mykobakteriálními infekcemi, jelikož geny kódující tyto proteiny jsou v netuberkulózních bakteriích (viz výše). Test umožňuje testování latentní tuberkulózy a zároveň je užitečný při diagnostice infekce *M. tuberculosis* komplex u klinicky nemocných osob. Pro potvrzení či vyloučení onemocnění tuberkulózu je ale nutné provést další klinická a diagnostická vyšetření (Cellestis, 2008).

K testu se používají specializované krevní zkumavky, určené k odběru plné krve. V nich probíhá inkubace krve po dobu 16-24 hodin, následně se vyšetří plazma na přítomnost INF- $\gamma$  vzniklého v reakci na peptidové antigeny.

Test má dva kroky. Nejprve se odebere plná krev do každé z odběrových zkumavek. Používá se zkumavka s negativní kontrolou, zkumavka s antigenem *M. tuberculosis* (zkumavka označená jako TBC antigen) a nepovinná zkumavka s mitogenem, kterou lze využít také jako pozitivní kontrolu. Zkumavky se musí inkubovat při teplotě 37 °C co nejdříve, nejpozději pak do 16 hodin od odběru.

Po 16 až 24 hodinách inkubace se zkumavky centrifugují, a ze získané plazmy se metodou ELISA vyšetří množství přítomného INF- $\gamma$  (IU/ml) (Cellestis, 2008).

Výsledek testu je pozitivní v případě, že reakce INF- $\gamma$  ve zkumavce TBC antigenu je významně vyšší než hodnota INF- $\gamma$  v negativní kontrole. Koncentrace INF- $\gamma$  ve zkumavce s negativní kontrolou se odečítá od koncentrace INF- $\gamma$  ve zkumavce s TBC antigenem a zkumavce s mitogenem (je-li použita).

Negativní výsledek testu nevylučuje možnost infekce *M. tuberculosis* nebo onemocnění tuberkulózou. Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny stádiem infekce, souběžnými chorobami ovlivňující imunitní stav organismu, nesprávnou manipulací se zkumavkami po odběru krve, nesprávným provedením metody atd. (Vroblová et al., 2009).

### 3.2.3 Činidla a potřebné vybavení

- **zkumavky pro odběr krve s antigenem tuberkulózy a kontrolou**
  1. Negativní kontrola (šedý kryt)
  2. TBC antigen (červený kryt)
  3. Mitogenová kontrola (fialový kryt)
- **součásti setu ELISA**
  1. Stripy pro mikrotitrační destičku
  2. Standard lidského INF- $\gamma$ , lyofilizovaný
  3. Zelený pufr (Diluent)
  4. Konjugát, 100x koncentrát lyofilizovaný
  5. 20x koncentrát promývacího pufru
  6. Roztok s enzymovým substrátem
  7. Enzymatický zastavovací roztok
- **další potřebné materiály**
  - inkubátor 37 °C
  - kalibrované pipety s nastavovacím objemem a kalibrovaná vícekanálová pipeta s jednorázovými špičkami
  - třepačka mikrotitračních destiček
  - demineralizovaná nebo destilovaná voda
  - promývačka mikrotitračních destiček

- čtečka mikrotitračních destiček vybavená filtrem 450 nm a referenčním filtrem 620 nm až 650 nm

### **3.2.4 Odběr vzorku a manipulace s ním**

Pro odběr vzorku se používají tři již zmíněné zkumavky: negativní kontrola (šedý kryt), TBC antigen (červený kryt), mitogenová kontrola (fialový kryt). Antigeny jsou přischlé na vnitřní straně zkumavek, proto je nezbytné obsah zkumavek důkladně promíchat s krví. Poté je potřeba je co nejdříve vložit do inkubátoru s teplotou 37 °C, a to nejpozději do 16 hodin po odběru.

Pro dosažení optimálních výsledků je nutné dodržovat určité zásady: u každého vyšetřovaného pacienta je nutné odebrat 1 ml krve venepunkcí přímo do jednotlivých zkumavek (zkumavky jsou validovány pro objemy v rozpětí od 0,8 do 1,2 ml). Dále je nutné zkumavky promíchat důkladným protřepáním po dobu 5 sekund, tak aby se krev rozprostřela po celém vnitřním povrchu zkumavky a v neposlední řadě je nutné zkumavky správně označit (Barth et al., 2008).

### **3.2.5 Pracovní postup**

(viz Příloha 3)

### **3.2.6 Interpretace výsledků**

Výsledky testu QuantiFERON – TB Gold IT je nutné hodnotit společně s epidemiologickými údaji, aktuálním zdravotním stavem a dalšími diagnostickými vyšetřeními pacienta. Hodnocení QF testu (viz Tabulky 2 a 3).

Tabulka 2: Zkumavky s negativní kontrolou a TB antigenem

Negativní kontrola [IU/ml]	TBC antigen mínus negativní kontrola [IU/ml]	QuantiFERON – TB [IU/ml]	Hlášení / Interpretace
≤ 8,0	< 0,35	Negativní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> NENÍ pravděpodobná
	≥ 0,35 a < 25 % hodnoty negativní kontroly		
	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty negativní kontroly	Pozitivní*	Infekce <i>M. tuberculosis</i> JE pravděpodobná
> 8,0	Jakýkoli výsledek	Neurčitý	Výsledky mají nevýpovědní reaktivitu k TBC-antigenu

Zdroj: Cellestis, 2008

\* U pacientů, kde není podezření na infekci *M. tuberculosis*, je možné první pozitivní výsledky konfirmovat opakováním testu původního vzorku plazmy v polovičním ředění (duplikát) v testu QuantiFERON – TB Gold ELISA. Pokud opakované testování ukazuje pozitivní výsledek, je nutné u daného pacienta považovat výsledek za pozitivní.

Tabulka 3: Zkumavky s negativní kontrolou, TB antigenem a mitogenem

Negativní kontrola [IU/ml]	TBC antigen mínus negativní kontrola [IU/ml]	Mitogen mínus negativní kontrola [IU/ml]*	QuantiFERON – TB [IU/ml]	Hlášení / Interpretace
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> NENÍ pravděpodobná
	≥ 0,35 a < 25 % hodnoty negativní kontroly	≥ 0,5		
	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty negativní kontroly	Jakýkoli výsledek	Pozitivní	Infekce <i>M. tuberculosis</i> JE pravděpodobná
	< 0,35	< 0,5	Neurčitý	Výsledky mají nevýpovědní reaktivitu k TBC antigenu
≥ 0,35 a < 25% hodnoty negativní kontroly	< 0,5			
> 8,0	Jakýkoli výsledek	Jakýkoli výsledek		

Zdroj: Cellestis, 2008

\* Odezva na pozitivní kontrolu s mitogenem (někdy i s TB antigenem) může být běžně mimo rozpětí čtečky mikrotitračních destiček. To nijak neovlivňuje výsledky testu.

- **Neurčité (INDETERMINATE) výsledky:**

Neurčitý výsledek v testu naznačuje, že u testovaného jedince nelze určit stav infekce vyvolané *M. tuberculosis*, tedy ani to, zda tato infekce reálně existuje. Výsledky tohoto typu mohou být důsledkem narušené obranyschopnosti organismu vlivem snížené imunitní odpovědi nebo vlivem chybně provedeného testu a indikují sníženou nebo neexistující schopnost reagovat s mitogen pozitivní kontrolou.

Neurčitý výsledek má informační hodnotu – naznačuje nezdařený test. Neurčité výsledky lze pozorovat zejména u osob, u nichž existuje důvod pro signifikantně nižší imunitní odpověď. U imunosuprimovaných osob nelze žádný test, hodnotící reaktivitu T buněk, považovat za spolehlivý s jednoznačným výsledkem.

Zařazení validované mitogen pozitivní kontroly do testu QFT-GIT umožňuje posoudit, zda je testovaný jedinec schopen adekvátní odpovědi a zda tedy existuje možnost získat validní výsledky testu.

Mitogen pozitivní kontrola funguje jako kontrola správné manipulace se vzorkem krve a jeho uskladněním před zahájením inkubace a zároveň slouží jako indikátor imunitního stavu jedince, který je vyšetřován (Vroblová et al., 2009).

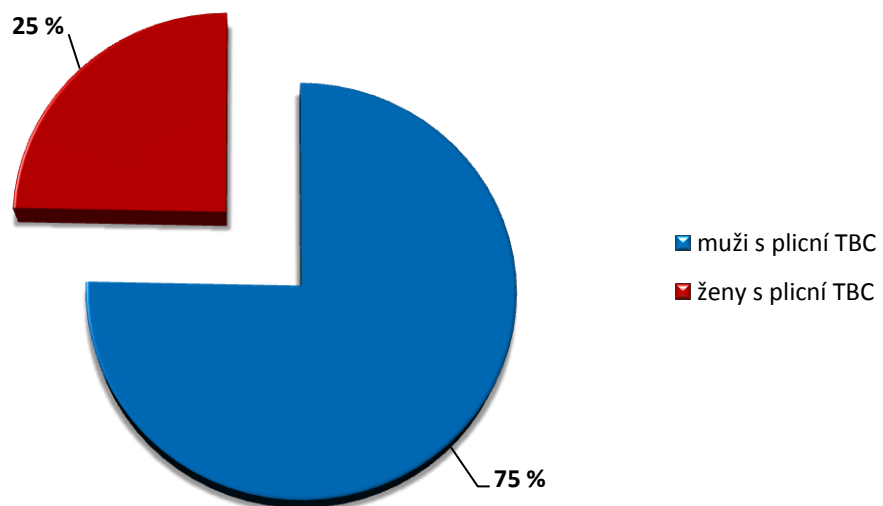
## 4. Výsledky

### 4.1 Distribuce pacientů s plicní tuberkulózou dle věku a pohlaví ve vzorku populace za období 2008 – 2016

V letech 2008 – 2016 bylo v Plicní léčebně Nemocnice České Budějovice, a.s. vyšetřeno 174 pacientů s podezřením na TBC. U 81 pacientů byla potvrzena plicní tuberkulóza. Pacienty s ověřenou plicní tuberkulózou tvořili ze 75 % muži (61 pacientů) a z 25 % ženy (20 patientek) (viz graf 1).

U mužů i u žen byla plicní tuberkulóza zaznamenána ve všech zvolených věkových kategoriích. U mužů byl nejvyšší výskyt ve věkové kategorii 31 – 50 a 51 – 70 let. U žen nelze vyhodnotit, vzhledem k nízkému počtu patientek, v jaké z věkových kategorií byl záchyt plicní tuberkulózy nejvyšší (viz grafy 2 a 3).

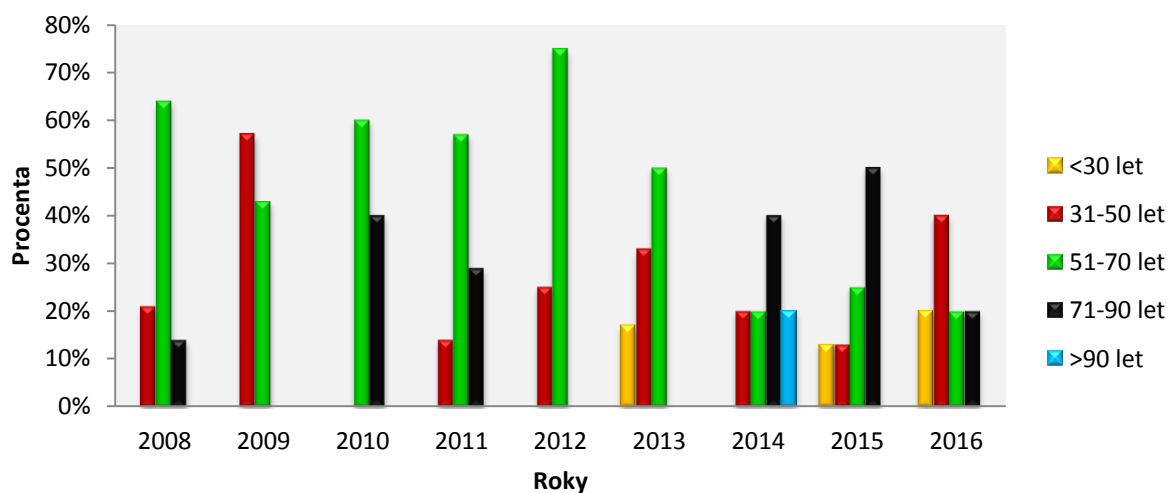
Graf 1: Procentuální vyjádření pacientů s ověřenou plicní tuberkulózou dle pohlaví.



Tabulka 4: Četnosti pacientů (mužů) v jednotlivých věkových kategoriích za období 2008 – 2016.

MUŽI									
	roky								
Věkové kategorie	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
< 30 let	0	0	0	0	0	1	0	1	1
31-50 let	3	4	0	1	1	2	1	1	2
51-70 let	9	3	3	4	3	3	1	2	1
71-90 let	2	0	2	2	0	0	2	4	1
> 90 let	0	0	0	0	0	0	1	0	0

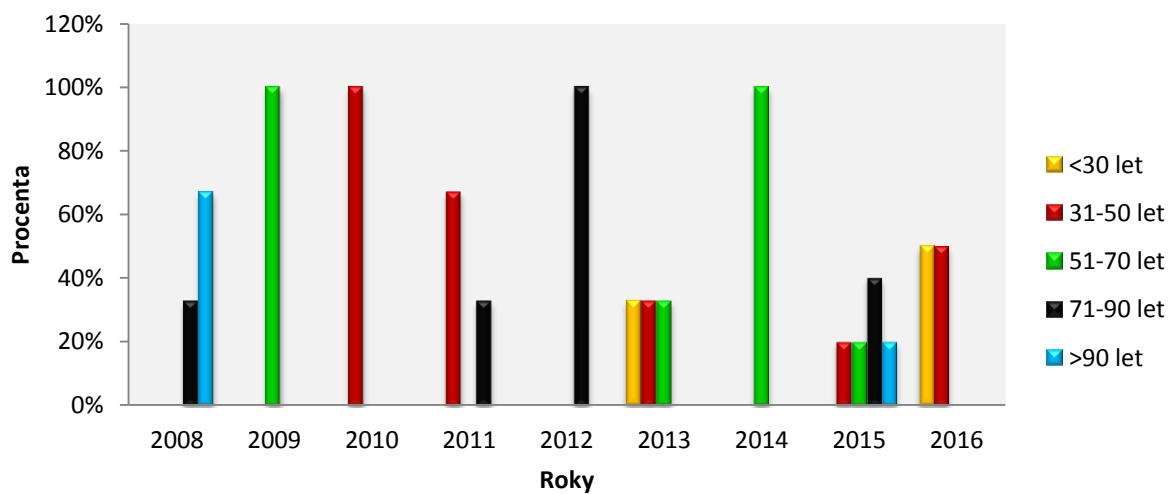
Graf 2: Procentuální vyjádření pacientů (mužů) dle věku za období 2008 – 2016.



Tabulka 5: Četnosti pacientek (žen) v jednotlivých věkových kategoriích za období 2008 – 2016.

ŽENY									
Věkové kategorie	roky								
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
< 30 let	0	0	0	0	0	1	0	0	1
31-50 let	0	0	1	2	0	1	0	1	1
51-70 let	0	1	0	0	0	1	1	1	0
71-90 let	1	0	0	1	1	0	0	2	0
> 90 let	2	0	0	0	0	0	0	1	0

Graf 3: Procentuální vyjádření pacientek (žen) dle věku za období 2008 – 2016.





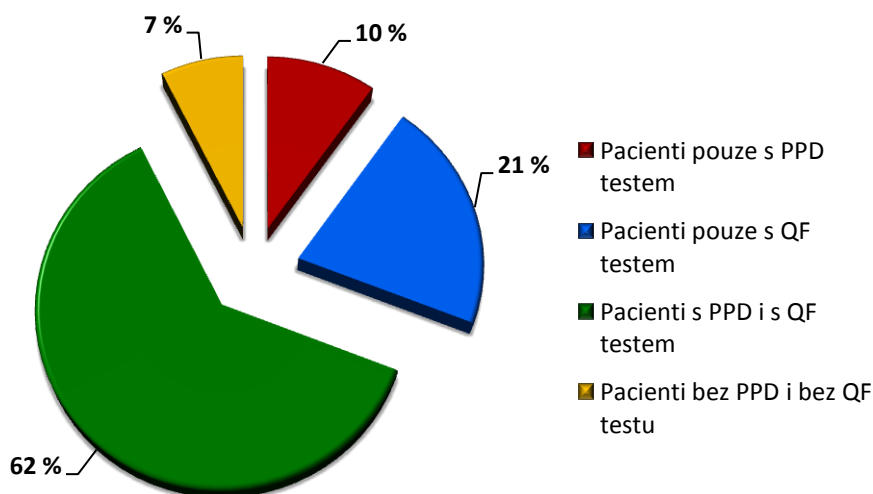
#### 4.2 Porovnání tuberkulinového kožního (PPD) a quantiferonového (QF) testu u pacientů s plicní tuberkulózou za období 2008 – 2016

Z celkového počtu pacientů s ověřenou plicní tuberkulózou (81) byl u 62 % z nich (50 pacientů) proveden jak tuberkulinový kožní, tak i quantiferonový test. U 21 % (17 pacientů) byl proveden pouze quantiferonový test, u 10 % (8 pacientů) pouze tuberkulinový kožní test. Pouze u 7 % (6 pacientů) z celkového počtu pacientů nebyl proveden žádný ze zmíněných testů (viz graf 4).

Tabulka 6: Četnosti pacientů s provedenými testy.

Pacienti s provedenými testy	Četnosti	Procenta
<b>Pacienti pouze s PPD testem</b>	8	10 %
<b>Pacienti pouze s QF testem</b>	17	21 %
<b>Pacienti s PPD i s QF testem</b>	50	62 %
<b>Pacienti, u kterých nebyl proveden žádný test</b>	6	7 %
<b>Celkem</b>	<b>81</b>	<b>100 %</b>

Graf 4: Procentuální vyjádření pacientů s provedenými testy.



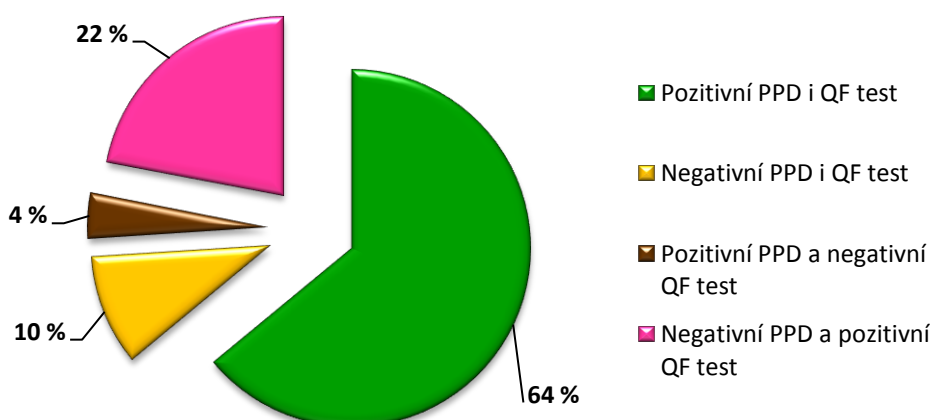
Z celkového počtu pacientů s provedeným PPD i QF testem (50 pacientů) byl pozitivní výsledek u obou testů zaznamenán v 64 % (32 pacientů). Negativní výsledek u obou sledovaných testů vyšel v 10 % (5 pacientů). Pozitivní PPD a zároveň negativní výsledek QF testu vyšel pouze ve 4 % (2 pacienti). Naopak negativní PPD a zároveň pozitivní výsledek QF testu vyšel ve 22 % (11 pacientů), což svědčí o vyšší citlivosti quantiferonového testu (viz graf 5).

Zároveň je vyjádřen trend v provádění PPD a QF testu. Tuberkulinový kožní test byl nejvíce prováděn v roce 2008. Postupně jeho indikování klesalo, s výjimkou roku 2015, kdy byl zaznamenán u 11 ze 13 pacientů pozitivních na TBC. Opačný trend byl v indikování quantiferonového testu, který měl od roku 2008 do roku 2016 stoupající tendenci (viz graf 6).

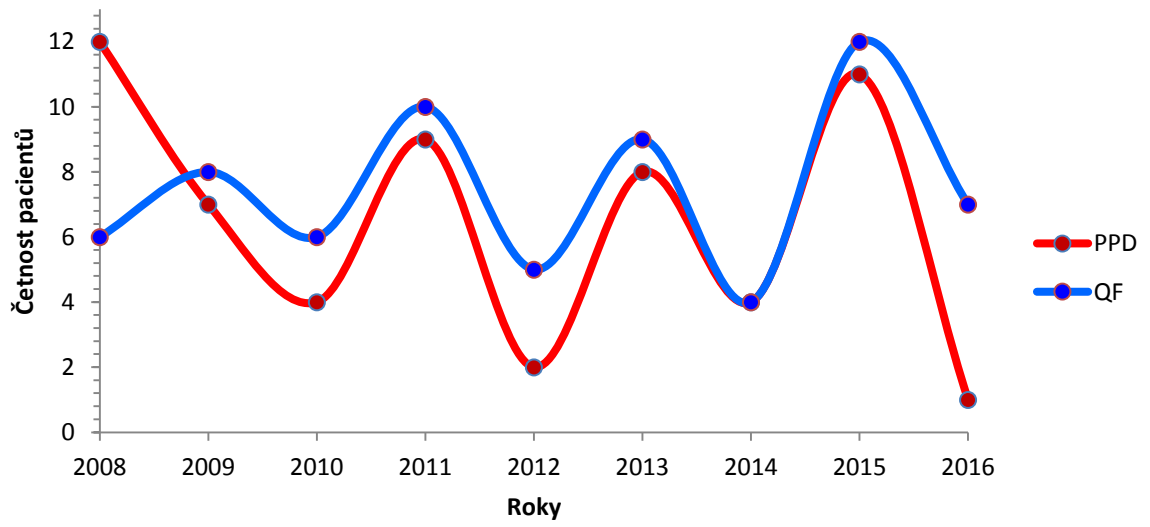
Tabulka 7: Pacienti s provedeným PPD i QF testem (50 pacientů). Porovnání obou testů.

Testy	Četnosti	Procenta
<b>Pozitivní PPD i QF test</b>	32	64 %
<b>Negativní PPD i QF test</b>	5	10 %
<b>Pozitivní PPD a negativní QF test</b>	2	4 %
<b>Negativní PPD a pozitivní QF test</b>	11	22 %
<b>Celkem</b>	<b>50</b>	<b>100 %</b>

Graf 5: Procentuální vyjádření porovnání tuberkulinového kožního a quantiferonového testu.



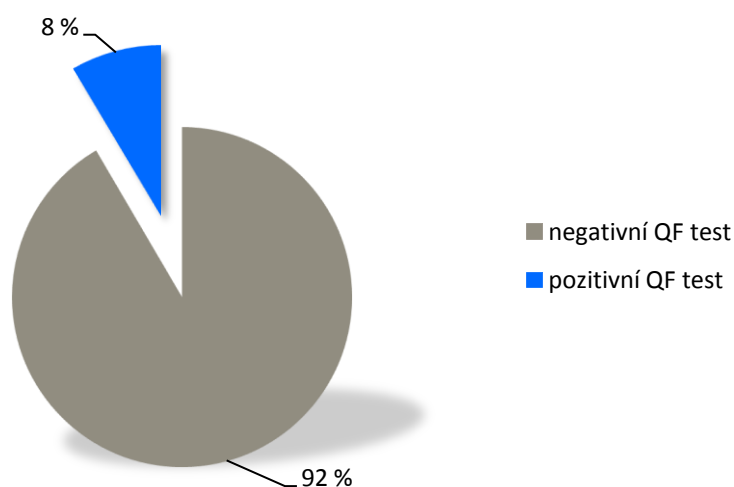
Graf 6: Grafické vyjádření trendu provádění PPD testu a QF testu v jednotlivých letech.



### 4.3 Realizace a vyhodnocení výsledků quantiferonového testu u pacientů za rok 2016

Quantiferon byl za rok 2016 celkem vyšetřen u 877 pacientů. U 74 pacientů (8 %) byl výsledek quantiferonového testu pozitivní (viz graf 7). Pozitivní výsledek QF testu byl porovnán s bakteriologickým vyšetřením a dále pak vyhodnocen z hlediska pohlaví, věku, diagnózy a zasílajícího oddělení.

Graf 7: Procentuální vyjádření pozitivních a negativních výsledků quantiferonového testu za rok 2016.

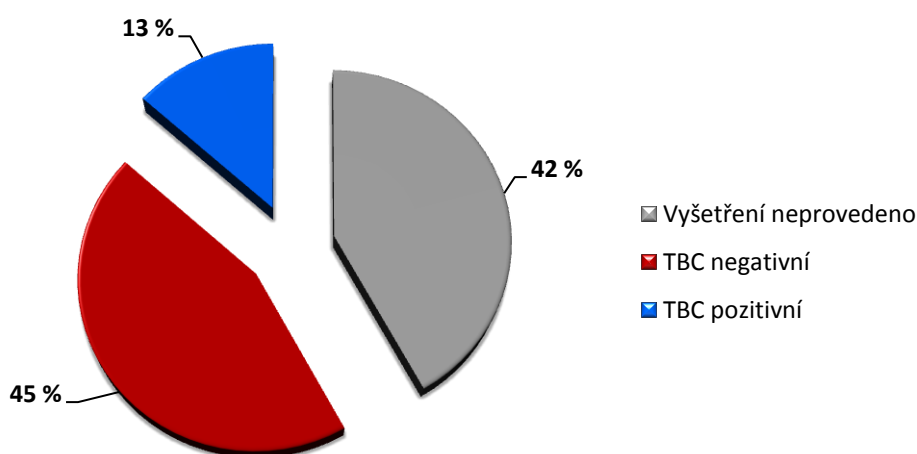


Pozitivní výsledek quantiferonového testu (u 74 pacientů) byl porovnán s bakteriologickým vyšetřením na průkaz BK (mikroskopie, kultivace). Tabulka 8 zahrnuje četnosti pacientů v jednotlivých kategoriích. Do kategorie „Vyšetření neprovedeno“ jsou zahrnuti pacienti, u kterých nebylo mikrobiologické vyšetření požadováno. Ve 44 % (u 32 pacientů) bylo bakteriologické vyšetření na průkaz BK negativní. V tomto případě by se mohlo jednat o infekci latentní. Tuberkulóza byla kulturačně potvrzena ve 14 % (u 10 pacientů) (viz graf 8).

Tabulka 8: Bakteriologické vyšetření u pacientů s pozitivním QF testem (74 pacientů).

Bakteriologické vyšetření	Četnosti	Procenta
<b>Vyšetření neprovedeno</b>	31	42 %
<b>TBC negativní</b>	33	45 %
<b>TBC pozitivní</b>	10	14 %
<b>Celkem</b>	<b>74</b>	<b>100 %</b>

Graf 8: Procentuální vyjádření bakteriologických vyšetření.



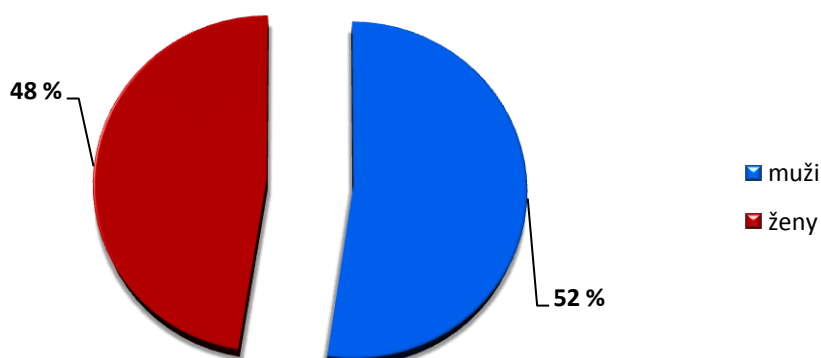
Kultivační vyšetření bylo provedeno u 43 pacientů, z toho u 33 pacientů bylo zároveň provedeno i PCR vyšetření materiálu. Pouze jeden pacient měl PCR vyšetření (s negativním nálezem) bez provedené kultivace.

PCR vyšetření bylo pozitivní u 9 pacientů. Kultivace byla pozitivní u 10 pacientů. V jednom případě se jednalo o pozitivitu PCR a negativitu kultivace. Ve dvou případech byla pozitivní kultivace a negativní PCR. V ostatních případech byly výsledky PCR a kultivace shodné. U jedné pacientky byla kultivace i PCR opakovaně negativní, pozitivní byl až pitevni materiál. U jiné pacientky s opakovaně negativním kultivačním i PCR nálezem byla TBC prokázána dříve (v roce 2013).

Pozitivní výsledek quantiferonového testu byl dále vyhodnocen z hlediska pohlaví, věku, diagnózy a zasílajícího oddělení.

Zastoupení mužů a žen, u kterých byl za rok 2016 vyšetřen quantiferon (celkem 877 pacientů), bylo téměř vyrovnané (viz graf 9). Nejvyšší počet vyšetřeného QF testu byl zaznamenán ve věkových kategoriích 31 – 50 a 51 – 70 let (viz graf 10). Z hlediska diagnózy tvořily nejvyšší podíl nemoci svalové a kosterní soustavy (28 %), nemoci trávicí soustavy (17 %), nemoci kůže a podkoží (14 %) a dále příznaky, znaky a nálezy nezařazené jinde (17 %). Nejvíce žádostí o provedení QF testu přišlo od ambulantních pacientů (29 %) a dále pak z Oddělení plicní a TBC (27 %). Také Gastroenterologické oddělení tvořilo značný podíl žádostí (17 %). Vše znázorňují grafy 11 a 12. Pro zajímavost byl vytvořen i graf 13, znázorňující podíl nejčastějších diagnóz u ambulantních pacientů. Nemoci svalové a kosterní soustavy jsou zastoupeny v 86 %.

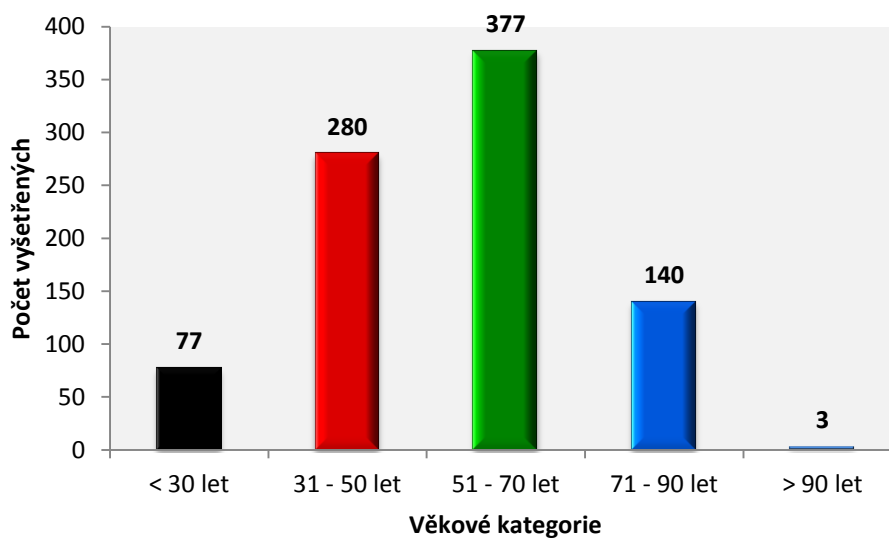
Graf 9: Procentuální vyjádření vyšetřeného quantiferonového testu (877 pacientů) dle pohlaví za rok 2016.



Tabulka 9: Četnosti vyšetřených osob v jednotlivých věkových kategoriích za rok 2016.

Věkové kategorie	Četnosti	Procenta
< 30 let	77	9 %
31 – 50 let	280	32 %
51 – 70 let	377	43 %
71 – 90 let	140	16 %
> 90 let	3	0 %
<b>Celkem</b>	<b>877</b>	<b>100 %</b>

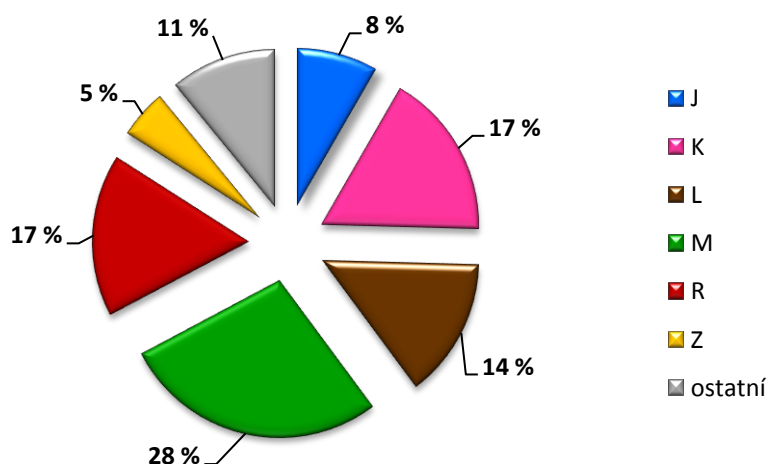
Graf 10: Grafické znázornění počtu vyšetřených osob v jednotlivých věkových kategoriích za rok 2016.



Tabulka 10: Vyhodnocení quantiferonového testu z hlediska diagnózy.

Diagnóza	Četnosti	Procenta
J – Nemoci dýchací soustavy	73	8 %
K – Nemoci trávicí soustavy	150	17 %
L – Nemoci kůže a podkožního vaziva	126	14 %
M – Nemoci svalové a kosterní soustavy	241	28 %
R – Příznaky, znaky a nálezy nezařazené jinde	147	17 %
Z – Faktory ovlivňující zdravotní stav	44	5 %
Ostatní	96	11 %
<b>Celkem</b>	<b>877</b>	<b>100 %</b>

Graf 11: Procentuální vyjádření quantiferonového testu dle diagnózy.

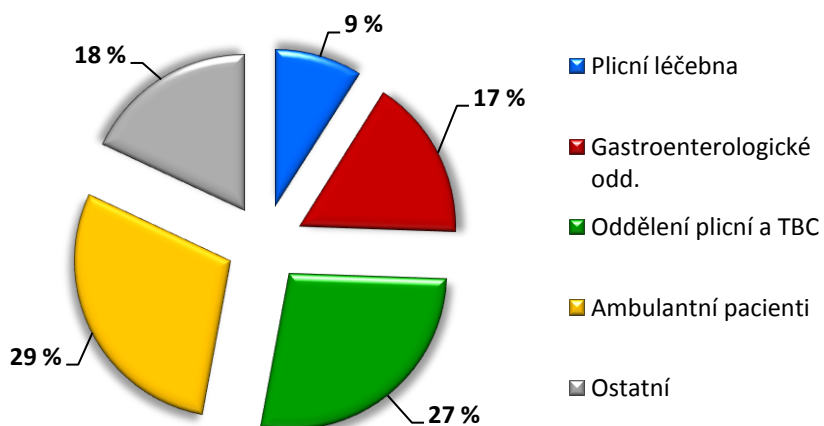


Tabulka 11: Quantiferonový test podle zasílajícího oddělení

Oddělení	Četnosti	Procenta
Plicní léčebna	79	9 %
Gastroenterologické odd.	145	17 %
Oddělení plicní a TBC	240	27 %
Ambulantní pacienti	255	29 %
Ostatní	158	18 %
<b>Celkem</b>	<b>877</b>	<b>100 %</b>



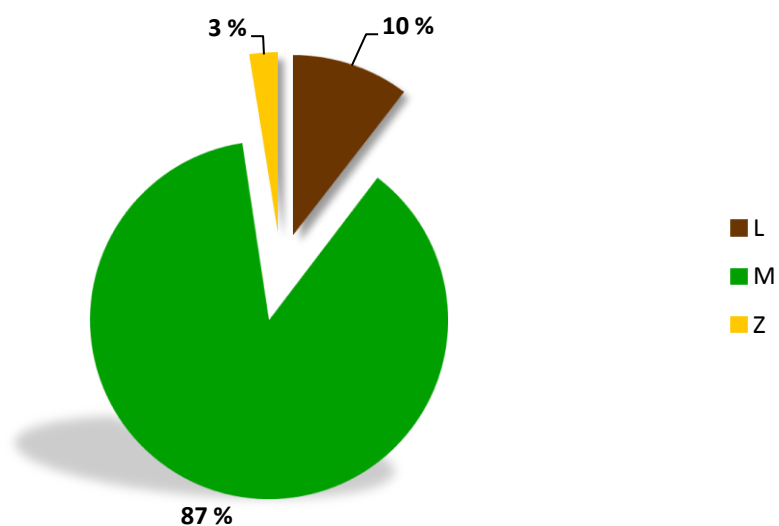
Graf 12: Procentuální vyjádření quantiferonového testu podle zasílajícího oddělení.



Tabulka 12: Nejčastější diagnózy u ambulantních pacientů (255 pacientů)

Diagnóza	Četnosti	Procenta
<b>L</b> - Nemoci kůže a podkožního vaziva	26	10 %
<b>M</b> - Nemoci svalové a kosterní soustavy	219	87 %
<b>Z</b> - Faktory ovlivňující zdravotní stav	6	2 %

Graf 13: Procentuální vyjádření nejčastějších diagnóz u ambulantních pacientů.



## 5. Diskuse

V této studii bylo jedním z cílů vytvořit statistický přehled výskytu plicní tuberkulózy u pacientů hospitalizovaných v Plicní léčebně Nemocnice České Budějovice, a.s. Plicní léčebna hospitalizuje pacienty z Jižních Čech a dále je také spádovou oblastí pro kraj Vysočina. Pro práci byla použita data od roku 2008 do roku 2016. Z počtu 174 pacientů vyšetřených v Plicní léčebně k vyloučení TBC byla u 81 z nich potvrzena plicní tuberkulóza. Poměrně nízký počet pozitivních pacientů je adekvátní tomu, že Jihočeský kraj se společně s Karlovarským a Zlínským krajem řadí mezi kraje s nejnižším výskytem tuberkulózy v ČR. Nejvyšší počet nemocných TBC hlásí i nadále hlavní město Praha (Základní přehled epidemiologické situace v ČR, 2015).

Pacienti s potvrzenou plicní tuberkulózou byli porovnání z hlediska pohlaví a věku. Jednou z mých hypotéz bylo, že výskyt plicní tuberkulózy bude zastoupen podobně u mužů i u žen. Z výsledků ale vyplynulo, že ze 75 % byla plicní tuberkulóza diagnostikována mužům. U žen to bylo pouze z 25 % (viz graf 1). Tento výsledek se shoduje i s údaji uváděnými ÚZIS za rok 2015, kde muži tvořili téměř 70 % případů (Základní přehled epidemiologické situace v ČR, 2015). Vyšší výskyt tuberkulózy u mužů potvrzuje i Výroční zpráva WHO za rok 2015, kde byla TBC celosvětově zaznamenána u 56 % mužů a u 34 % žen (Global tuberculosis report, 2016). Další mojí hypotézou bylo potvrzení výskytu plicní tuberkulózy spíše ve vyšších věkových kategoriích. Z výsledků vyplývá, že u mužů se plicní tuberkulóza potvrdila ve všech zvolených věkových kategoriích, nicméně nejvyšší záchyt je patrný ve věkových kategoriích 31 – 50 a 51 – 70 let (viz graf 2). U žen byl výskyt plicní tuberkulózy zaznamenán taktéž ve všech zvolených věkových kategoriích. U žen vzhledem k nízkému počtu pacientek v jednotlivých letech nelze zhodnotit, v jaké věkové kategorii se jednalo o nejvyšší výskyt plicní TBC.

Dalším cílem bylo porovnání citlivosti tuberkulinového kožního a quantiferonového testu. Poměrně pozitivním zjištěním bylo, že oba dva testy byly zároveň provedeny u 50 (62 %) z 81 pacientů s potvrzenou plicní TBC. Pouze v 7 % nebyl u pacientů proveden žádný z testů (viz graf 4). Další průzkum ukázal, že pozitivní výsledek PPD i QF testu vyšel v 64 % (u 32 pacientů) a negativní výsledek u obou testů v 10 % (u 5 pacientů). Pozitivní výsledek PPD a negativní výsledek

QF testu odpovídal pouze 4 % (2 pacienti). Naopak negativní výsledek PPD testu a zároveň pozitivní výsledek QF testu byl zjištěn ve 22 % (u 11 pacientů). To jednoznačně hovoří o vyšší citlivosti quantiferonového testu (viz graf 5). Mantoux test, ve kterém je v současnosti používán právě PPD (Purified Protein Derivative of Tuberculine) je jednou z nejstarších diagnostických metod používaných v medicíně pro vyhledávání pacientů s latentní formou TBC. U rizikových pacientů bohužel často tento test selhává (falešně negativní výsledek). Další nevýhodou je jeho nízká specifita. PPD obsahuje více než 200 antigenů přítomných jak v patogenních, tak i v některých nepatogenních mykobakteriích a především v BCG vakcíně. Tedy u pacientů očkovaných BCG vakcínou a neinfikovaných *M. tuberculosis* může vycházet pozitivní výsledek Mantoux testu (Nayak a Acharjya, 2012). Naproti tomu quantiferonový test založený na specifické, buňkami zprostředkované imunitní reakci je vhodnou náhradou kožního tuberkulinového testu pro diagnostiku latentní i aktivní TBC. QF test je založen na detekci INF- $\gamma$  v plazmě vytvořeného specifickými T-lymfocyty. Ty jsou *in vitro* stimulovány proteiny specifickými pro *M. tuberculosis*. Proteiny ESAT-6, CFP-10 a TB 7.7 jsou specifické pro patogenní druhy komplexu *M. tuberculosis* a nevyskytují se ve vakcinačních kmenech *M. bovis*, BCG, ani v netuberkulózních mykobakteriích s výjimkou *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. flavescens* a *M. gastri*. Výhodou testu je také minimální zátěž pro pacienta, jelikož spočívá v odběru 3 ml periferní krve do speciálních odběrových zkumavek dodávaných výrobcem (Brock et al., 2004).

Quantiferonový test jsem v posledním z mých cílů podrobila samostatné analýze. Vyhodnotila jsem jej z hlediska pozitivního a negativního výsledku, pohlaví, věku, diagnózy a zasílajícího oddělení. Pozitivní výsledek byl porovnán s bakteriologickým vyšetřením. Z 877 pacientů, u kterých byl za rok 2016 vyšetřen quantiferon, mělo 74 z nich (8 %) pozitivní výsledek (viz graf 7). Dále jsem tedy pracovala pouze s pozitivními výsledky QF testu. V grafu 8 jsem porovnála pozitivní QF test s bakteriologickým vyšetřením. Tuberkulóza byla potvrzena ve 14 % (u 10 pacientů). Negativní bakteriologický průkaz byl ve 45 % (u 33 pacientů), nicméně quantiferonový test prokazuje kromě aktivní infekce i infekci latentní. Zajímavým zjištěním bylo, že ve 42 % (u 31 pacientů) nebylo mikrobiologické vyšetření vůbec provedeno. Což bych, vzhledem k významu QF testu při diagnostice tuberkulózy (viz teoretická část práce), nepředpokládala. Z hlediska pohlaví bylo zastoupení mužů a žen téměř vyrovnané (viz graf 9). Nejvíce byl quantiferonový test vyšetřen u osob ve věkové kategorii 31 – 50 a 51 – 70 let (viz graf 10). Z hlediska diagnózy tvořily nejvyšší podíl

nemoci svalové a kosterní soustavy (28 %), nemoci trávicí soustavy (17 %), nemoci kůže a podkoží (14 %) (viz graf 11). Nejvyšší podíl právě těchto diagnóz lze určitě vysvětlit tím, že quantiferon se vyšetřuje u osob před zahájením biologické léčby. Biologická léčba využívající preparáty blokující účinky *TNF $\alpha$*  (tumor nekrotizující faktor alfa) je vhodná u osob s revmatologickými chorobami (např. revmatoidní artritida, psoriatická artritida), s idiopatickými střevními záněty (např. Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida) a u osob s některými kožními chorobami (např. lupénka). Tyto preparáty blokují autoimunitně navozenou zánětlivou reakci. *TNF $\alpha$*  je ale důležitý i k tvorbě granulomů sloužících k vytvoření infekčního agens. V důsledku této léčby mají tito pacienti výrazně zvýšené riziko onemocnění tuberkulózou. Proto musí být každý pacient před zahájením biologické léčby vyšetřen pneumologem pro vyloučení aktivní nebo latentní tuberkulózy (Brown a Leshner, 2009; CDC, 2000). Nejvíce žádostí o vyšetření QF testu přišlo od ambulantních pacientů (29 %), téměř shodný počet potom z Oddělení plicního a TBC (27 %). Poměrně výrazný podíl žádostí (17 %) přišlo z Gastroenterologického oddělení (viz graf 12). Vzhledem k tomu, že nejvyšší podíl tvořili ambulantní pacienti, i u nich jsem se pro zajímavost zaměřila na diagnózu. Z 86 % to byly nemoci svalové a kosterní soustavy, z 10 % potom nemoci kůže a podkoží (viz graf 13). Lze tedy předpokládat, že ve většině případů se jednalo o vyšetření před případným zahájením biologické léčby.

## 6. Závěr

V práci byl zhodnocen výskyt plicní tuberkulózy u pacientů hospitalizovaných v Plicní léčebně Nemocnice České Budějovice, a.s. za období od roku 2008 do roku 2016. Z celkového množství všech získaných dat se u 81 pacientů potvrdila plicní tuberkulóza. Muži tvořili 75 % všech případů, ženy pouze 25 %. U mužů byla potvrzena hypotéza výskytu plicní tuberkulózy především ve vyšším věku, u žen vzhledem k nízkému počtu pacientek v jednotlivých letech nelze zhodnotit, v jaké věkové kategorii se jednalo o nejvyšší výskyt plicní TBC.

Důležité bylo pro tuto práci porovnání citlivosti tuberkulinového kožního a quantiferonového testu. Vzhledem k proočkování naší populace se dalo předpokládat, že citlivost tuberkulinového kožního testu bude nižší než citlivost quantiferonového testu. Výsledky tuto mou hypotézu potvrdily. Pozitivním zjištěním bylo, že oba dva testy byly zároveň provedeny u 50 z 81 pacientů s potvrzenou plicní tuberkulózou. Nutné je ale podotknout, že na vzestupu je právě diagnostika quantiferonovým testem oproti tuberkulinovému kožnímu testu, který je na ústupu.

V samotném závěru práce jsem se zaměřila na vyhodnocení quantiferonového testu za rok 2016. Z celkového počtu 877 vyšetřených pacientů byl pouze u 74 z nich (8 %) pozitivní výsledek. Zajímavé bylo porovnání pozitivního výsledku quantiferonového testu s bakteriologickým vyšetřením, kde ve 42 % nebylo mikrobiologické vyšetření vůbec požadováno. To jsem vzhledem k významu quantiferonového testu při diagnostice TBC, především latentní formy, neočekávala. Je možné, že u většiny z nich nevykazoval jejich zdravotní stav podezření na TBC. Vezmeme-li ale v úvahu nespecifické příznaky tohoto onemocnění, bylo by určitě na místě průkaz tohoto vyšetření požadovat. Při procentuálním vyhodnocení nejčastějších diagnóz a zasílajících oddělení, lze předpokládat, že značný podíl pro vyšetření quantiferonového testu měl souvislost s prevencí před možným zahájením biologické léčby.

Ačkoliv mají oba dva porovnávané testy své „pro“ a „proti“ měly by vždy sloužit pouze jako doplňková metoda při diagnostice tuberkulózy. Základním laboratorním vyšetřením zůstává i nadále mikroskopie a kultivace.

## 7. Seznam použité literatury

1. BARTH, R. E., MUDRIKOVA, T., HOPELMAN, A. I. M., 2008. Interferon-gamma release assays (IGRAs) in high-endemic settings: could they play a role in optimizing global TB diagnostics? *International Journal of Infectious Diseases* [online]. 12(6), p. e1-e6. [cit. 2017-04-27]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2008.03.026>. Dostupné z: [http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(08\)00104-5/fulltext](http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(08)00104-5/fulltext)
2. BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J., 1996. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha: Marvil, s. 305 – 311. ISBN 80-238-0297-6.
3. BROCK, I., WELDINGH, K., LILLEBAEK, T., FOLLMANN, F., ANDERSEN, P., 2004. Comparison of Tuberculin Skin Test and New Specific Blood Test in Tuberculosis Contacts. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 170(1), 65-69 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1164/rccm.200402-232OC. ISSN 1073-449x. Dostupné z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200402-232OC>
4. BROWN, A. J. a LESHNER, J. L., 2009. Anti-tumor necrosis factor therapy and interpreting tuberculin skin tests. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 60(5), e21-e22 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1016/j.jaad.2008.12.024. ISSN 01909622. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962209000048>
5. CARDING, S. R., EGAN, P. J., 2000. The importance of  $\gamma\delta$  T cells in the resolution of pathogen-induced inflammatory immune responses. *Immunological Reviews* [online]. 173(1), 98-108 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2000.917302.x. ISSN 0105-2896. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-065X.2000.917302.x>
6. Cellestis, QuantiFERON® - TB Gold (*In – tube*) – příbalový leták, 2008. Číslo dokumentu: 05990301C.
7. *Centers for Disease Control and Prevention*, 2000. Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection. *MMWR Mortal Morb* [online]. Rep 49: 1-54. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/Mmwr/preview/mmwrhtml/rr4906a1.htm>

8. ČERMÁK, P., HAVELKOVÁ, M., 2010. Laboratorní diagnostika mykobakteriálních infekcí. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. **16**(2), 36-42.
9. FLYNN, J. L., CHAN, J., 2001. Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology* [online]. **19**(1), 93-129 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.93. ISSN 0732-0582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.19.1.93>
10. FRITH, J., © 2017. History of Tuberculosis. Part 1 – Phthisis, consumption and the White Plague. *Journal of Military and Veterans' Health* [online]. **22**(2), [cit. 2017-04-24]. ISSN 1839-2733. Dostupné z: <http://jmvh.org/article/history-of-tuberculosis-part-1-phthisis-consumption-and-the-white-plague/>
11. *Global tuberculosis report 2016*, 2016. [online]. WHO. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
12. GREENWOOD, D., SLACK, R. C. B., PEUTHERER, J. F. a kolektiv, 1999. *Lékařská mikrobiologie. Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vydání české. Praha: Grada Publishing, spol. s. r. o. ISBN 80-7169-365-0.
13. HRODEK, O., VAVŘINEC, J., 2002. *Pediatric*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-178-5.
14. KOLEK, V., KAŠÁK, V., VAŠÁKOVÁ, M. a kolektiv., 2014. *Pneumologie*. 2. rozšířené vydání. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-387-9.
15. KOLEKTIV AUTORŮ., 1998. *Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí*. Praha: Národní referenční laboratoř pro mykobakterie, SZÚ Praha ve spolupráci s firmou Trios, s.r.o.
16. KREJSEK, J., KOPECKÝ, O., 2004. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK. ISBN 80-86225-50-X.
17. KUO, H. C., LIU, C. A., OU, C. Y., HSU, T. Y., YANG, K. D., 2010. Correlation between atopy and tuberculin/Candida skin test reactivity in a bacillus Calmette-Guérin-vaccinated cohort. *Allergy* [online]. **65**(12), 1625-1626 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02427.x. ISSN 01054538. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1398-9995.2010.02427.x>

18. *Leták BCG VACCINE SSI*, 2009. [online]. Nemocnice Tábor. [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: [https://www.nemta.cz/wp-content/uploads/2014/11/Letak\\_BCG\\_VACCINE\\_SSI.pdf](https://www.nemta.cz/wp-content/uploads/2014/11/Letak_BCG_VACCINE_SSI.pdf)
19. LEUNG, C. C., RIEDER, H. L., LANGE, C. a YEW, W. W., 2011. Treatment of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis*: update 2010. *European Respiratory Journal* [online]. **37**(3), 690-711 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1183/09031936.00079310. ISSN 0903-1936. Dostupné z: <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00079310>
20. MEIER, T., EULENBRUCH, H. P., WRIGHTON-SMITH, P., ENDERS, G., REGNATH, T., 2005. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. **24**(8), 529-536 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1007/s10096-005-1377-8. ISSN 0934-9723. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-005-1377-8>
21. *Metodika očkování proti TBC v ČR*, 2012. [online]. MZCR. [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: [http://www.mzcr.cz/Verejne/obsah/metodika-ockovani-proti-tbc-v-cr\\_2546\\_5.html](http://www.mzcr.cz/Verejne/obsah/metodika-ockovani-proti-tbc-v-cr_2546_5.html)
22. NAYAK, S. a ACHARJYA, B., 2012. Mantoux test and its interpretation. *Indian Dermatology Online Journal* [online]. **3**(1), 2- [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.4103/2229-5178.93479. ISSN 2229-5178. Dostupné z: <http://www.idoj.in/text.asp?2012/3/1/2/93479>
23. POWELL III, R. D., WHITWORTH, W. C., BERNARDO, J., MOONAN, P. K., MAZUREK, G. H., 2011. Unusual Interferon Gamma Measurements with QuantiFERON-TB Gold and QuantiFERON-TB Gold In-Tube Tests. *PLoS ONE* **6**(6): e20061. doi:10.1371/journal.pone.0020061
24. *Registr tuberkulózy (RTBC)*, 2017. [online]. ÚZIS ČR. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/registry/organu-ochrany-verejneho-zdravi/registr-tuberkulozy>
25. SVOBODOVÁ, J., 2013. Případy tuberkulózy v ČR v letech 2009-2012 vyvolané neobvyklými druhy komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. *Zprávy Centra Epidemiologie a mikrobiologie*. **22**(1), 12-14. SZÚ Praha.



26. *TB Elimination. Tuberculin Skin Testing*, 2011. [online]. CDC. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/testing/skintesting.pdf>
27. THOMAS, D. M., © 2006. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* [online]. **100**(11), p. 1862-1870 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: [http://www.resmedjournal.com/article/S0954-6111\(06\)00401-X/fulltext](http://www.resmedjournal.com/article/S0954-6111(06)00401-X/fulltext)
28. *Tuberculosis - Fact sheets*, 2017. [online]. WHO. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
29. VAŠÁKOVÁ, M., 2013. Tuberkulóza v České republice. Současný stav. Diagnóza, léčba, prevence. *Vnitřní lékařství* [online]. **59**(4), 284-289 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/vnitri-lekarstvi-clanek/tuberkuloza-v-ceske-republice-soucasny-stav-diagnoza-lecba-prevence-40578>
30. VOTAVA, M. a kolektiv., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.
31. VOTAVA, M., RŮŽIČKA, F., WOZNICOVÁ, V., ČERNOHORSKÁ, L., DVOŘÁČKOVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ HEROLDOVÁ, M., HOLÁ, V., ZAHRADNÍČEK, O., 2010. *Lékařská mikrobiologie: Vyšetřovací metody*. 1. vyd. Brno: Neptun., s. 495. ISBN 978-80-86850-04-7.
32. VOTAVA, V., HOMOLKA, J., 2012. *Tuberkulóza*. 4. upravené vydání. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2070-1.
33. VROBLOVÁ, V., JANKOVIČOVÁ, K., TROJÁČKOVÁ-KUDLOVÁ, M., KREJSEK, J., 2009. Detekce latentní tuberkulózy quantiferon-TB Gold test, možnosti a úskalí metody. *Praktický lékař* [online]. **89**(4), 204-209, [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/prakticky-lekar-clanek/detekce-latentni-tuberkulozy-quantiferon-tb-gold-test-moznosti-a-uskali-metody-5542>
34. *Základní informace o ÚZIS ČR*, 2017. [online]. ÚZIS ČR. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/nas>
35. *Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v ČR v roce 2015*, 2015. [online]. ÚZIS ČR. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/node/7727>

36. CATANZANO, T. M., 2016. Primary Tuberculosis Imaging. [online]. *Medscape*. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/358610-overview>
37. Positive TB Skin Test, 2014. [www.newhealthadvisor.com](http://www.newhealthadvisor.com) [online]. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://www.newhealthadvisor.com/Positive-TB-Skin-Test.html>

## 8. Přílohy

Příloha 1: Tabulka 13: Standardizované léčebné režimy

Standardizované režimy	Iniciální fáze léčby	Pokračovací fáze
Pro nové TBC pacienty (s předpokládanou nebo známou senzitivitou na antituberkulotika)	2 měsíce HRZE*	4 měsíce HR
Pro nové TBC pacienty (pro pacienty z oblastí s vysokým výskytem rezistence na isoniazid a testy citlivosti nebyly provedeny nebo výsledek není k dispozici před začátkem pokračovací fáze)	2 měsíce HRZE	4 měsíce HRE
Pro dříve léčené TBC pacienty	2 měsíce HRZES/1 měsíc HRZE	5 měsíců HRE

Zdroj: Kolek et al., 2014

\*) *H* – isoniazid, *R* – rifampicin, *Z* – pyrazinamid, *S* – streptomycin, *E* – ethambutol

Příloha 2: Tabulka 14: Kategorie nemocných a doporučené léčebné režimy TB

Kategorie	Charakteristiky pacientů	TB léčebné režimy	
		iniciální fáze	pokračovací fáze
I	nová mikroskopicky pozitivní TBC nová mikroskopicky negativní plicní TBC s rozsáhlým poškozením parenchymu konkomitantní onemocnění HIV závažné formy mimoplicní TBC	preferované režimy 2 HRZE*	preferované režimy 4 HR 4 (HR) 3
		další režimy 2 (HRZE) 3 2 HRZE**	další režimy 4 (HR) 3 6 HE
II	dříve léčená mikroskopicky pozitivní plicní TBC relaps léčba po přerušení selhání léčby	preferované režimy 2 HRZES/1HRZE	preferované režimy 5 HRE
		další režimy 2 (HRZES) 3/1 (HRZE) 3	další režimy 5 (HRE) 3
III	nová mikroskopicky negativní plicní TBC méně závažné formy mimoplicní TBC	preferované režimy 2 HRZE***	preferované režimy 4 HR 4 (HR) 3

		další režimy 2 (HRZE) 3 nebo 2 HRZE	další režimy 4 (HR) 3 nebo 6 HE
IV	chronické formy TBC mikroskopicky pozitivní i po opakované kontrolované léčbě MDR – TB nebo suspektní MDR - TB	speciální standardizovaný nebo individualizovaný režim	

Zdroj: Kolek et al., 2014

*H – isoniazid, R – rifampicin, Z – pyrazinamid, S – streptomycin, E – ethambutol. Číslo před zkratkami léků u jednotlivých režimů vyjadřuje počet měsíců podávání uvedeného režimu a číslo 3 za závorkou označuje intermitentní podávání léků třikrát týdně. V ostatních případech jsou léky podávány denně.*

- \* místo ethambutolu může být použit streptomycin. U TB meningitidy by měl být použit streptomycin místo ethambutolu
- \*\* intermitentní aplikace léků není v iniciační fázi doporučena, pokud má být v pokračovací fázi použita kombinace HE
- \*\*\* ethambutol může být vynechán v průběhu iniciační fáze léčby u pacientů s limitovanou nekavernózní, mikroskopicky negativní TB, kteří jsou HIV-negativní, u pacientů s méně závažnými formami extrapulmonální TB a u malých dětí s primární TB

### Příloha 3: Pracovní postup QF testu

#### • 1. Inkubace krve

- Odběr krve pacienta do zkumavek určených k testu a jejich důkladné protřepání tak, aby došlo k promíchání s antigeny přischlými na vnitřní straně zkumavek.
- Inkubace zkumavek ve svislé poloze při teplotě 37 °C po dobu 16 – 24 hodin.
- Centrifugace zkumavek 5 až 15 minut při 2000 až 3000 g RCF (g) pro oddělení plazmy a erytrocytů.
- Odběr vzorku plazmy z každé zkumavky ke kvantifikaci koncentrace INF- $\gamma$ .

#### • 2. ELISA interferonu $\gamma$

- Jednotlivé složky soupravy ELISA ponechat temperovat na pokojovou teplotu minimálně 60 minut, s výjimkou 100x koncentrovaného konjugátu.
- Rekonstituce standardu na 8,0 IU/ml destilovanou nebo demineralizovanou vodou. Příprava 4 standardních ředění.

- Rekonstituce lyofilizovaného 100x koncentrát konjugátu v destilované nebo demineralizované vodě.
- Příprava konjugátu se zeleným pufrem. Do všech jamek aplikovat 50  $\mu$ l.
- Do mikrotitračních jamek aplikovat 50  $\mu$ l vzorků testované plazmy a 50  $\mu$ l standardů. Promíchat třepačkou.
- Inkubace 120 minut při pokojové teplotě.
- Mikrotitrační jamky promýt promývacím pufrem.
- Do mikrotitračních jamek aplikovat 100  $\mu$ l enzymatického substrátového roztoku. Promíchat třepačkou.
- Inkubace 30 minut při pokojové teplotě.
- Do všech mikrotitračních jamek přidat 50  $\mu$ l zastavovacího roztoku. Promíchat třepačkou.
- Výsledky odečítat při vlnové délce 450 nm s referenčním filtrem o vlnové délce 620 až 650 nm.
- Analýza vzorku.

## 9. Seznam zkratk

AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome (Syndrom získaného selhání imunity)

ART – Acidorezistentní tyčka

AT – Antituberkulotika

BCG – Bacillus Calmette - Guérin

BK – Bacil Kochův

CFU – Colony forming unit

CMI – Cell Mediated Immunity

ČR – Česká republika

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

DOTS – Directly observed therapy, short - course

ELISA – Enzymová imunoanalýza

EMB – Ethambutol

EUROSTAT – Statistický úřad Evropské unie

HIV – Human Immunodeficiency Virus

IGRA – Interferon gamma release assay

IL – Interleukin

INF $\gamma$  – Interferon gamma

INH – Isoniazid

ISBT – Informační systém bacilární tuberkulózy

LCR – Ligase Chain Reaction (ligázová řetězová reakce)

L - J – Löwenstein – Jensenova půda

MDR – Multi drug resistant (multirezistentní kmeny)

MHC – Major histocompatibility komplex (hlavní histokompatibilní komplex)

MTC – Mycobacterium tuberculosis complex

NRL – Národní referenční laboratoř

NZIS – Národní zdravotnický informační systém

OSN – Organizace spojených národů

PAS – p – aminosalicylová kyselina

PCR – Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

PPD – Purified Protein Derivate (purifikovaný proteinový derivát)

PZA – Pyrazinamid

QF – quantiferon, quantiferonový

QFT – GIT - QuantiFERON® TB Gold In – Tube test  
RMP – Rifampicin  
RTBC – Registr tuberkulózy  
STM – Streptomycin  
TB, TBC – Tuberkulóza  
TNF $\alpha$  – tumor nekrotizující faktor alfa  
TST – Tuberculin skin test (tuberkulinový kožní test)  
ÚZIS – Ústav zdravotnických informací a statistiky  
WHO – Světová zdravotnická organizace  
XDR – Extensively drug resistant (extenzivně rezistentní kmeny)