

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta

**Laboratorní diagnostika mykobakterií se zaměřením  
na bakteriologický průkaz**

bakalářská práce

Autor práce: Martina Velková  
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant  
  
Vedoucí práce: MUDr. Petra Dvořáková

Datum odevzdání práce: 14. 8. 2013

## Abstrakt

Rod *Mycobacterium* zahrnuje téměř 150 druhů, přičemž jednotlivé druhy vykazují různou patogenitu. Významným představitelem, původce tuberkulózy člověka, je *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulóza je v současné době celosvětově rozšířené infekční onemocnění. Podle WHO je přibližně 1,9 miliardy lidí infikováno, ročně asi 9,4 milionů onemocní a 1,7 milionů na toto onemocnění umírá. Česká republika se řadí k zemím s nízkým výskytem TBC. Incidence se pohybuje okolo 6/100 000 ročně a mortalita je v posledním období velmi nízká, pod 0,5/100 000. Z velké škály netuberkulózních mykobakterií má celosvětově stoupající tendenci výskyt komplexu *Mycobacterium avium*.

Laboratorní metody hrají důležitou roli v diagnostice onemocnění. I když jsou v současné době k dispozici rychlé molekulárně - genetické metody a metody založené na imunitní odpovědi organismu, základní vyšetřovací metodou přímého průkazu stále zůstává mikroskopický a kultivační průkaz. Mikroskopie je základní metodou pro většinu patologických vzorků, především pro sputum. Citlivost této metody není vysoká, přesto je důležitá. Umožňuje rychle odhalit rozsáhlá klinicky i epidemiologicky závažná onemocnění. U kultivačního průkazu se za „zlatý standard“ považuje kultivace na pevných vaječných půdách. V současné době bývá doplňována kultivací v automatickém detekčním systému, který urychluje dobu detekce.

Tato práce byla prováděna v období 1.1. - 6.6. 2013 v Nemocnici Č. Budějovice a.s. v Laboratoři lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie. Do studie bylo celkem zahrnuto 400 sput, které byly zpracovány a vyšetřovány. Cílem bylo ověřit a porovnat účinnost dekontaminačních metod za použití HCl a NALC. Zároveň byla sledována výtěžnost a doba detekce v klasické kultivaci a v automatickém detekčním systému BACTEC<sup>TM</sup> MGIT<sup>TM</sup> 960. Automatický systém využívá neradiometrickou fluorescenční technologii. Kultivace probíhá v tekutém Middlebrook 7H9 médiu s přídavkem antimikrobiálních látek (polymyxin B, amfotericin B, kyselina nalidixová, trimetoprim, azlocilin). U klasické kultivace byly použity pevné vaječné půdy: Löwenstein-Jensenova a půda podle Ogawy. Jednotlivé výsledky pak ukazují, že u

metody s HCl byla kontaminace celkem u 1 % vzorků. Pro jednotlivé metody pak v 5 % v BACTEC™ MGIT™ 960 a 4 % v klasické kultivaci. Ve srovnání u metody s NALC byla kontaminace celkem u 21 % vzorků a z toho pro jednotlivé metody 26 % v BACTEC™ MGIT™ 960 a 50 % v klasické kultivaci. Z těchto výsledků je tedy patrné, že metoda s NALC má nižší účinnost, podíl kontaminace oproti metodě s HCL se zvýšil o 20 %. Dekontaminační metoda s NALC je doporučena výrobcem pro BACTEC™ MGIT™ 960. Byla ale shledána nevyhovující a nebylo v ní možné nadále pokračovat. Porovnáním výtěžnosti a doby detekce izolovaných kmenů u jednotlivých metod bylo prokázáno, že BACTEC™ MGIT™ 960 vykazuje větší citlivost než klasická kultivace, neboť ze 17 celkem izolovaných kmenů BACTEC™ MGIT™ 960 zachytil 15 oproti 10 izolovaným kmenům v klasické kultivaci. Patrný je i výrazně kratší čas detekce pozitivních vzorků. Průměrný čas detekce u BACTEC™ MGIT™ 960 byl 16,2 dní, zatímco u klasické kultivace 31 dní. Potvrdilo se, že systém BACTEC™ MGIT™ 960 dosahuje lepších výsledků, ale optimalizace je dosaženo kombinováním obou používaných metod. Ze zpracovaných statistických údajů za období 2010 - 2012 je patrný pokles, ale k výraznému snížení nedochází. Znatelný je pouze pokles *Mycobacterium bovis BCG*, což se dá vysvětlit tím, že očkování proti tuberkulóze není již od roku 2011 prováděno plošně, ale podle nové platné legislativy pouze u rizikových skupin. Zajímavou skutečností je i to, že každoročně je v laboratoři nejvyšší záchyt ve věkové skupině nad 60 let.

## Abstract

The genus *Mycobacterium* includes nearly 150 species, with each species showing different pathogenicity. An important representative, cause of tuberculosis is *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis is currently a globally widespread infectious disease. According to WHO, about 1.9 billion people are infected, each year about 9.4 million get sick and 1.7 million die because of the disease. Czech Republic ranks among countries with a low incidence of tuberculosis. The incidence is about 6/100 000 per year and mortality in the last period is very low, below 0.5/100 000. From the large range of nontuberculous mycobacteria the occurrence of *Mycobacterium avium* has an increasing trend worldwide.

Laboratory methods play an important role in disease diagnostic. Although there are currently available fast molecular genetic methods and methods based on cell response, basic diagnostic method of direct evidence is still microscopy and cultivation. Microscopy (staining by Ziehl-Neelsen and fluorescence microscopy) is the primary method for most of the specimens, especially for sputum. The sensitivity of this method is not very high because for the detection of a positive finding in 1 mm<sup>3</sup> is needed at least 10<sup>5</sup> microbes. However, the method is important because it can fastly proof extensive clinical and epidemiological serious diseases. The “Golden standard” is today the cultivation on solid egg media. Nowadays it is filled in automatic detection system, which accelerates the time of detection.

The thesis was carried out in the Laboratory of Medical Microbiology, Bacteriology department, Hospital Ceske Budejovice in the period from 1.1.2013 till 6.6.2013, and included 400 sputa, which were processed and examined. The purpose was to compare the effectiveness of decontamination methods with HCl and with NALC, and to monitor the recovery and detection for the automatic detection system and conventional cultivation. In the automatic system using the BACTEC<sup>TM</sup> MGIT<sup>TM</sup> 960 Non-Radiometric fluorescent technology is cultivation in liquid Middlebrook 7H9 medium supplemented with antimicrobials (polymyxin B, amphotericin B, nalidixic

acid, trimethoprim, azlocilin). The classical culture used solid egg culture medium: Lowenstein-Jensen and culture medium by Ogawa.

The individual results then show that the method of HCl had the overall contamination of 1 % of the samples. For each methods in 5 % BACTEC™ MGIT™ 960 and 4 % in the conventional cultivation. In comparison the method NALC, had the overall contamination of 21 % of the samples. For the individual methods in 26 % of BACTEC™ MGIT™ 960 and 50 % in the conventional cultivation. From these results it is obvious that the method with the NALC has lower efficiency, the proportion of contamination compared to the method with HCL increased by 20 %. Decontamination with the NALC method recommended by the manufacturer for BACTEC™ MGIT™ 960 was found to be unsatisfactory and was canceled. Comparing the recovery and the detection of the strains isolated in individual methods showed that the BACTEC™ MGIT™ 960 exhibits greater sensitivity than conventional cultivation, since the total of 17 strains isolated BACTEC™ MGIT™ 960 captured 15 against 10 strains isolated in conventional cultivation. There is also a significantly shorter time to detect positive samples. The average detection time for BACTEC™ MGIT™ 960 was 16.2 days, while a conventional culturing was 31 days. It was confirmed that the BACTEC™ MGIT™ 960 system achieves better results, but optimization is achieved by combining the two methods used. There is an apparent decrease in detection of mycobacteria from the processed statistical data of the strains isolated during the period 2010 - 2012, but a substantial reduction does not occur. Noticeable is only the decline of the isolated stains of *Mycobacterium bovis BCG*, which can be explained by the fact that the vaccination against tuberculosis is since 2011 no longer carried out across the board, but according to the new legislation in force only in high-risk groups. An interesting fact is that every year the highest laboratory detection is found in the age group of over 60 years.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14.8. 2013

.....

Martina Velková

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala MUDr. Dovinové Petře za její odborné vedení při psaní této bakalářské práce, za poskytování důležitých rad a informací, ale ve velké míře za její trpělivost. Poděkování patří i kolegyním z Pracoviště bakteriologie. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině za její podporu.

# Obsah

Úvod .....	12
1. Současný stav .....	15
1.1 Rod <i>Mycobacterium</i> .....	15
1.2 Rozdělení .....	17
1.2.1 Obligátně patogenní druhy.....	17
1.2.2 Podmíněně patogenní druhy a saprofyti .....	18
1.3 Evidence a povinná hlášení v ČR.....	20
1.3.1 Registr tuberkulózy (RT) .....	20
1.3.2 Informační systém bacilární tuberkulózy (ISBT).....	21
1.3.3 Epidemiologická situace v ČR .....	21
1.4 Laboratorní průkaz.....	22
1.4.1 Bakteriologický průkaz.....	22
1.4.1.1 Odběr a transport materiálu .....	22
1.4.1.2 Příprava vzorku.....	23
1.4.1.3 Mikroskopický průkaz.....	24
1.4.1.3.1 Barvení dle Ziehl-Neelsena.....	24
1.4.1.3.2 Fluorescenční barvení .....	25
1.4.1.4 Kultivační průkaz .....	26
1.4.1.4.1 Kultivace na půdách.....	26
1.4.1.4.2 Kultivace v automatickém detekčním systému .....	28
1.4.1.5 Druhová identifikace .....	29
1.4.1.5.1 Základní fenotypové metody.....	29
1.4.1.5.2 Imunochromatografický test.....	31
1.4.1.5.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF .....	32
1.4.1.5.4 Molekulárně - genetické metody .....	32
1.4.1.6 Léková citlivost.....	33
1.4.1.6.1 Proporční metoda dle Canettiho .....	33
1.4.1.6.2 Automatické detekční systémy.....	34



1.4.2 Molekulárně - genetický průkaz .....	34
1.4.3 Imunologický průkaz .....	35
2. Cíl práce .....	36
3. Metodika .....	37
3.1 Materiál a metody .....	37
3.2 Vybavení, kultivační média, reagentie, pomůcky .....	39
3.3 Pracovní postupy .....	39
3.3.1 Dekontaminační metoda s HCl .....	39
3.3.2 Dekontaminační metoda s NALC .....	40
3.3.3 Kultivace: vaječné půdy LJ a Ogawa .....	40
3.3.4 Kultivace: automatický detekční systém BACTEC™ MGIT™ 960.....	40
3.3.5 Fluorescenční barvení (nativní nátěr) .....	41
3.3.6 Barvení dle ZN (ověření narostlé kultury) .....	41
4. Výsledky .....	42
4.1 Porovnání a ověření účinnosti dekontaminačních metod .....	42
4.1.1 Hodnocení účinnosti metody s HCl.....	43
4.1.2 Hodnocení účinnosti metody s NALC.....	44
4.2 Porovnání výtěžnosti a doby detekce použitých kultivačních metod.....	45
4.2.1 Hodnocení výtěžnosti v klasické kultivaci a BACTEC™ MGIT™ 960 .....	45
4.2.2 Hodnocení doby detekce v klasické kultivaci .....	47
4.2.3 Hodnocení doby detekce v BACTEC™ MGIT™ 960.....	48
4.3 Statistický přehled izolovaných kmenů dle věku za období 2010 - 2012.....	49
4.3.1 Statistický přehled za období 2010.....	49
4.3.2 Statistický přehled za období 2011 .....	51
4.3.3 Statistický přehled za období 2012.....	52
5. Diskuse .....	53
6. Závěr .....	57
7. Seznam použité literatury .....	58
8. Klíčová slova.....	64
9. Přílohy.....	65

## Seznam použitých zkratk

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome (Syndrom získaného selhání imunity)  
AML - Antimikrobiální látky  
ART - Acidorezistentní tyčka  
ATT - Antituberkulóza  
BACTEC MGIT - BACTEC™ MGIT™ 960 - automatický detekční systém  
BBL MGIT - BBL™ MGIT™ 7 ml  
BCG - Bacillus Calmette-Guérin  
BD - Becton, Dickinson and Company  
bp - base pair (komplementární pár bází)  
CFU - Colony forming unit  
CO<sub>2</sub> - Oxid uhličitý  
ČR - Česká republika  
Da - Dalton (kDa - kilo Dalton)  
DNA - Deoxyribonukleová kyselina  
ELISA - Enzymová imunoanalýza  
HCl - Kyselina chlorovodíková  
HIV - Human Immunodeficiency Virus  
H<sub>2</sub>O - Voda  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Kyselina sírová  
IGRA - Interferon gama uvolňující testy  
INF-γ - Interferon gama  
ISBT - Informační systém bacilární tuberkulózy  
LJ - Löwenstein-Jensenova půda  
M - molarita  
MALDI TOF - Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight  
MDR - Multi drug resistant (multirezistentní kmeny)  
MIC - Minimální inhibiční koncentrace  
NaCl - Chlorid sodný

NALC - N-acetyl-L-cystein  
NaOH - Hydroxid sodný  
Na<sub>3</sub> citrát - Citát sodný  
NJDT - Národní jednotka dohledu nad tuberkulózou  
NTM - Netuberkulózní mykobakteria  
QFT-G - QuantiFERON<sup>®</sup> TB Gold  
QFT-GIT - QuantiFERON<sup>®</sup> TB Gold In-Tube  
Ogawa - půda podle Ogawy  
PANTA - BACTEC<sup>™</sup> MGIT<sup>™</sup> PANTA<sup>™</sup>  
PBAK - Pracoviště bakteriologie  
PCR - Polymerázová řetězová reakce  
rRNA - Ribozomální ribonukleová kyselina  
RT - Registr tuberkulózy  
TB - Tuberkulózní mykobakteria  
TBC - Tuberkulóza  
TDR - Total drug resistant (totálně rezistentní kmeny)  
UV - Ultrafialové záření  
WHO - Světová zdravotnická organizace  
XDR - Extensively drug resistant (extrémně rezistentní kmeny)  
ZN - Barvení dle Ziehl-Neelsena

## Úvod

Označení *Mycobacterium* („houbovitá bakterie“) pochází z roku 1896 a bylo navrženo K. B. Lehmannem a R. O. Neumannem (řecky „mykés“ - houba a „baktron“ - tyč, hůl). Bylo určeno podle toho, že jejich pomalý růst a charakter růstu na povrchu tekuté půdy (povlak) zdánlivě připomíná podobnost s plísněmi [Klaban 1999]. Ve skutečnosti ale s plísněmi nemají nic společného. Mykobakterie jsou příbuzné bakteriálním rodům *Corynebacterium* a *Nocardia* [Votava et al. 2003]. Zmínky o nich jsou již z roku 1868. První mykobakterium objevil norský lékař Gerhard Henrick Armauer Hansen (1841 - 1912) u nemocného leprou, označované jako *Mycobacterium leprae Hanseni* (Hansenův bacil) [Šula 1965]. Významným představitelem vyvolávající specifické infekční onemocnění, původce tuberkulózy (TBC) člověka, je *Mycobacterium tuberculosis*. Toto onemocnění provází lidstvo již od počátků existence lidské populace. Vyskytovalo se již ve Starém Řecku, tak i v Říši římské a označovalo se pojmem phtisis. Název vystihoval jeden z hlavních příznaků onemocnění, úbytek tělesné hmotnosti. Do češtiny se překládal jako soucotiny, úbytě. Termín tuberkulóza byl zaveden teprve v roce 1834 německým klinikem Schönleinem. Tímto označením chtěl vystihnout charakteristický rys onemocnění - tuberkulózní uzlík. Objev etiologického agens *Mycobacterium tuberculosis* zveřejnil 24. března 1882 v Berlíně na schůzi Fyziologické společnosti německý lékař a mikrobiolog **Robert Koch** (1843 - 1910). Podrobně popsal morfologické, kultivační a biologické vlastnosti. Od té doby je vnímáno etiologicky. Pro *Mycobacterium tuberculosis* se proto též používá termín BK - bacil Kochův [Homolka et al. 2012]. Za svůj objev dostal R. Koch v roce 1905 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu a na jeho počest byl 24. březen vyhlášen Světovou zdravotnickou organizací (WHO) „Světovým dnem boje proti tuberkulóze“.

V současné době je toto specifické infekční onemocnění celosvětově rozšířené. Je druhou nejčastější smrtící infekční chorobou na celém světě (po AIDS). Problematika TBC byla, vzhledem ke své závažnosti, proto zahrnuta do zasedání programu Světové zdravotnické organizace pro 21. století. Podle WHO je přibližně 1,9 miliardy lidí infikováno, ročně asi 9,4 milionů onemocní a 1,7 milionů na toto onemocnění umírá.

Tuberkulóza stále zůstává chorobou spojenou s nízkou životní úrovní. Přes 95 % případů se vyskytuje převážně v rozvojových zemích. Nejhorší situace je v subsaharské Africe a jihovýchodní Asii, nejčastější je výskyt v Indii a Číně. K poklesu incidence dochází celosvětově, ale vzhledem ke vzniku onemocnění převážně v lidnatých krajinách, absolutní počet infikovaných neklesá. V roce 2009 byla celosvětová incidence TBC 137 / 100 000. V České republice se pohybuje okolo 6 / 100 000 ročně a mortalita je v posledním období velmi nízká, pod 0,5 / 100 000. Tímto se ČR řadí mezi země s nízkou incidencí a výskyt je nadále klesající [Kolek et al. 2011].

Zdrojem nákazy je nemocný člověk, který vylučuje mykobakteria. Obecným předpokladem přenosu infekce je nutný těsný a dlouhodobý kontakt s nemocným. K přenosu infekce nejčastěji dochází inhalační cestou (kapénková nákaza), tzn. branou vstupu infekce jsou plicní alveoly (85 - 90 %). Vzácně k nákaze dochází zažívacím traktem (alimentárně) nebo při kontaktu přes kůži (intradermálně). Inkubační doba je v rozmezí 4 týdnů až do 2 let po expozici. Onemocnění může klinicky probíhat manifestní nebo latentní formou. Onemocnění manifestuje u méně než 10 % infikovaných osob [Kolek et al. 2011].

Vhodná léčba, ale i prevence onemocnění závisí na rychlém a spolehlivém výsledku, proto se doporučuje kombinovat více laboratorních testů [Parrish et al. 2011]. Základní vyšetřovací metodou stále zůstává přímý mikroskopický a kultivační bakteriologický průkaz [Votava et al. 2010]. K rychlému přímému bezkultivačnímu průkazu komplexu *Mycobacterium tuberculosis* se používají molekulárně - genetické metody. Vzhledem k tomu, že se prokazují funkční i neživotaschopné mykobakterie, měly by být použity pouze jako doplněk k standardně používaným laboratorním metodám [Alli et al. 2011]. Metodami nepřímého průkazu jsou testy, které jsou založeny na detekci imunitní odpovědi organismu. Detekují jak latentní infekce, tak manifestní. V současné době jsou využívány jako schůdná náhrada kožního tuberkulinového testu [Homolka et al. 2012].

Téma pro mou bakalářskou práci jsem si zvolila vzhledem ke stále trvající závažnosti onemocnění. Na bakteriologický průkaz jsem se zaměřila, neboť stále zůstává „zlatým standardem“ v diagnostice mykobakterií. Cílem mé práce bylo

zaměření na vlastní přípravu vzorku při zpracování - účinnost dekontaminačních metod a na porovnání používaných kultivačních metod, jak z hlediska výtěžnosti, tak z hlediska doby detekce. Zároveň jsem zpracovala statistický přehled za období 2010 - 2012. Veškerá zpracování jsem prováděla v Centrálních laboratořích Nemocnice Č. Budějovice, a.s. v Laboratoři lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie.

# 1. Současný stav

## 1.1 Rod *Mycobacterium*

Dle Bergey's manual of Systematic Bacteriology je rod *Mycobacterium* řazen do čeledi *Mycobacteriaceae*, řádu *Actinomycetales* a třídy *Actinobacteria*. Rod *Mycobacterium* zahrnuje téměř 150 druhů, přičemž jednotlivé druhy vykazují různou patogenitu [Kolek et al. 2011]. Bakterie řadící se do této skupiny mají společné neobvyklé morfologické, kultivační a patogenní vlastnosti. Morfologické - k obarvení nelze použít běžný postup dle Grama, kultivační - při použití speciálních půd roste většina kmenů velmi pomalu a patogenní - řadí se sem původci vyvolávající tuberkulózu a lepru. Způsobují chronické infekce, neboť v jejich patogenezi velmi důležitou roli hraje reakce makroorganismu a buněčná imunita [Votava et al. 2003].

Z morfologického hlediska jsou mykobakteria štíhlé, obvykle granulované, rovné nebo lehce zahnuté tyčky, jejichž délka bývá variabilní, od kokovitých až po vláknité formy [Bednář et al. 1996, Homolka et al. 2012]. Délka kolísá mezi 1,5 - 5  $\mu\text{m}$ , ale u některých kmenů, většinou u aviárních, je až dvojnásobná - 8  $\mu\text{m}$ . Šířka obvykle nepřesahuje 0,5  $\mu\text{m}$  [Šula 1965]. Tyčky jsou nepohyblivé a nesporulující. I když se nebarví Gramem, jsou obvykle považovány za grampozitivní [Murray et al. 2007]. Uspořádání tyček je variabilní. Vyskytují se jednotlivě, síťovitě, ale i v podobě shluků několika paralelně uspořádaných tyček tvořící hadovité útvary, které připomínají spletené provazce. Tento jev se označuje jako *cording* (angl. „*cord*“ - provazec) a je typický pro virulentní kmeny - komplex *M. tuberculosis*, také pro *M. kansasii* a ve výjimečném případě může být i u jiných mykobakteriálních druhů [Votava et al. 2003].

Charakteristickým znakem pro tento rod je vysoký obsah volných a vázaných lipidů v jejich buněčné stěně. Tato lipidová složka dosahuje až 20 i více procent váhy bakteriální sušiny. Tukové látky jsou především zastoupeny mastnými kyselinami a odvozenými estery, alkoholy nebo ketony. Jsou součástí komplexních mykobakteriálních fosfolipidů, glykolipidů a lipoproteinů. Mastné kyseliny, které mají

vysoký počet uhlíků (u mykobaktérií od C<sub>60</sub> do C<sub>90</sub>) a specifickou strukturu, se označují jako mykolové kyseliny [Bednář et al. 1996].

Dalším z charakteristických znaků je acidorezistence - odolnost vůči kyselinám, zásadám i alkoholům. Z toho je odvozen jejich obecný název - acidorezistentní tyčky (ART). Tyčky jsou sice obtížně barvitelné, ale jsou-li jednou obarveny, tak si barvivo udrží, i když jsou vystaveny účinku organických a anorganických látek. Tato vlastnost je základem pro mikroskopický průkaz [Šula 1965].

Ve vztahu ke kyslíku jsou mykobakteria aerobní. Generační doba je ve srovnání s jinými mikroby velmi dlouhá (20 - 30 hodin) [Homolka et al. 2012]. Množení se děje převážně příčným dělením. Pokud existuje dělení podélné, tak je velmi vzácné. Vzácnější formou množení bývá větvení. Lze ho pozorovat při určitých nepříznivých podmínkách pro vývoj, a to zvláště u *Mycobacterium avium* [Šula 1965]. Optimální teplotou pro růst je 37 - 38 °C. Některá mykobakteria lze kultivovat i při nižší (25 - 30 °C) nebo vyšší teplotě (42 °C). Pro kultivaci se používají pevné a tekuté půdy [Homolka et al. 2012].

Mykobakteria nejsou producenty toxinů, ale vysoce složitých makromolekulárních bioproduktů - antigenů, které jsou součástí buněčné stěny, vyskytují se v cytoplazmě a také se částečně vylučují extracelulárně. Nejznámějším antigenem, který připravil již Koch je tuberkulin. Původní preparát se označoval jako starý tuberkulin (*Tuberculinum vetus*) a měl sloužit k diagnóze tuberkulózy. Získával se zahuštěním tekuté půdy po oddělení bakteriální masy. Dnes se používá čištěný tuberkulin označovaný P. P. D. (z angl. *Purified Protein Derivative*), který se získává pomocí zdokonalené techniky vysrážením proteinového komplexu (extrakt polypeptidů) z filtrátu mykobakteriální kultury. Využívá se ke kožnímu testování, při kterém se testuje buněčná hypersenzitivita opožděného typu. Aplikuje se intradermálně, proto se též používá označení kožní tuberkulinový test (Mantoux test). U neinfikovaných nebo neimunních jedinců tuberkulin reakci nevyvolává. U osob infikovaných nebo vakcinovaných dochází v místě vpichu po 24 - 48 hodinách ke vzniku zánětlivého infiltrátu [Bednář et al. 1996].



## 1.2 Rozdělení

Podle patogenity lze jednotlivé druhy rodu *Mycobacterium* rozdělit: obligátně patogenní druhy, oportunně patogenní druhy a saprofyti [Kolektiv autorů 1998].

### 1.2.1 Obligátně patogenní druhy

Agens řazená do skupiny obligátně patogenních druhů (viz tab. 1) jsou vzhledem k jejich virulenci patogenní pro člověka i zvířata. Kromě bakterií komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, která jsou vyvolavatelem onemocnění - tuberkulózy se do této skupiny též řadí i *Mycobacterium leprae*, vyvolavatele onemocnění - lepry (malomocenství) [Greenwood et al. 1999].

OBLIGÁTNĚ PATOGENNÍ DRUHY	
<b>pomalů rostoucí</b>	komplex <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium bovis BCG</i> <i>Mycobacterium africanum</i>
<b>nerostoucí <i>in vitro</i></b>	<i>Mycobacterium leprae</i>

Tab. 1: Obligátně patogenní druhy

Zdroj: Votava et al. 2003

Mikroorganismy komplexu *Mycobacterium tuberculosis* postihují jak plíce (v 85 %) - plicní tuberkulóza, tak i ostatní orgány (v 15 %) - mimoplicní tuberkulóza (např. lymfatické uzliny, klouby, kosti, urogenitální trakt). Nejčastějším příčinným agens onemocnění (95 % případů) je *Mycobacterium tuberculosis*. Diagnostika onemocnění TBC se opírá o anamnézu, klinické projevy chronického zánětu a rtg nález, přičemž nedílnou součástí je laboratorní průkaz patogena. Léčebný proces spočívá v podávání kombinace antituberkulotik v trvání nejméně 6 měsíců [Kolek et al. 2011].

U většiny kmenů je citlivost na antimikrobiální látky u neléčených nemocných zpravidla plně zachována [Schindler 2010].

*Mycobacterium leprae* se vyskytuje v tropických zemích (Afrika, Asie a Jižní Amerika). Typickými znaky onemocnění jsou ohraničená ložiska se ztrátou kožní citlivosti, plošná zánětlivá ložiska a zánětlivé zduření periferních nervů. V pozdních stádiích dochází ke ztrátě nebo deformaci končetin [Votava et al 2003]. Vzhledem k tomu, že v ČR onemocnění způsobené tímto agens není aktuální, nebude tomuto tématu dále v této práci věnována pozornost.

### **1.2.2 Podmíněně patogenní druhy a saprofyti**

Tato skupina zahrnuje řadu agens, která jsou méně virulentní než obligátně patogenní mykobakteria. Jsou potenciálně patogenní pro člověka, ale též mohou být pouhými saprofyty. Dle kritérií, která se při identifikaci používají (morfologie, rychlost růstu, tvorba pigmentu, optimální teplota) se dále ještě rozdělují do 4 skupin (viz tab. 2): I. fotochromogeny - tvorba pigmentu za světla; II. skotofotochromogeny - tvorba pigmentu ve tmě i za světla; III. nefotochromogeny - bez tvorby pigmentu; IV. rychle rostoucí [Homolka et al. 2012]. Tuto klasifikaci navrhl již v roce 1959 botanik Ernest H. Runyon [Kubín et al. 1986].

K jejich pojmenování se též využívá termínů: „atypická mykobakteria“, „jiná než tuberkulózní mykobakteria“, „oportunní patogeny“. Pro onemocnění, jehož vyvolavatelem jsou, se používá termín mykobakteriáza (NTM). Jejich charakteristickou vlastností je rezistence k antimikrobiálním látkám [Kolek et al. 2011]. Tyto druhy představují významnou mikrobiální složku přírodních biotopů. Rezervoárem bývají vodní plochy (sladkovodní, mořské), půda, prach a živočichové (drůbež, prasata, dobytek) [Schindler et al. 2010]. Mykobakteriázy způsobují chronická zánětlivá onemocnění. Postihují především plíce, ale i ostatní orgány (lymfatické uzliny, kůže, měkké tkáně). Vzácněji jsou postiženy klouby, kosti nebo urogenitální trakt. Vzhledem k tomu, že jejich virulence je menší, tak se u zdravých jedinců téměř neuplatní, a proto se nejčastěji vyskytují u imunodeficientních osob. Z velké škály druhů má celosvětově stoupající

tendenci výskyt komplexu *Mycobacterium avium*. V ČR jsou nejčastějším původcem tohoto onemocnění agens ze skupiny komplexu *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium kansasii* [Kolek et al. 2011].

<b>PODMÍNĚNĚ PATOGENNÍ DRUHY A SAPROFYTI</b>	
<b>I. FOTOCHROMOGENY</b>	
<b>pomalů rostoucí</b>	<i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium marinum</i>
<b>II. SKOTOFOTOCHROMOGENY</b>	
<b>pomalů rostoucí</b>	<i>Mycobacterium gordonae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycobacterium xenopi</i>
<b>III. NEFOTOCHROMOGENY</b>	
<b>pomalů rostoucí</b>	komplex <i>Mycobacterium avium</i> <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>Avium</i> <i>Mycobacterium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i>  <i>Mycobacterium ulcerans</i>
<b>IV. RYCHLE ROSTOUCÍ</b>	
	<i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium fortuitum</i> <i>Mycobacterium chelonae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i>

Tab. 2: Podmíněně patogenní druhy a saprofyti

Zdroj: Homolka et al. 2003

## **1.3 Evidence a povinná hlášení v ČR**

Zákonná povinnost hlášení údajů o TBC a NTM existuje v České republice již od padesátých let 20. století. Platí pro všechny lékaře, kteří u nemocných diagnostikují nově zjištěné onemocnění tuberkulózou nebo mykobakteriózou, recidivu tuberkulózy nebo mykobakteriózy, a to i při úmrtí osoby z jiných příčin s aktivní tuberkulózou nebo mykobakteriózou. Povinnost se vztahuje i při podezření na onemocnění tuberkulózou nebo mykobakteriózou.

Závazné předpisy upravující hlášení infekčních onemocnění:

- Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů
- Vyhláška MZ č. 306/2012 Sb., o podmínkách předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče
- Vyhláška MZ ČR, č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce

Hlášení jsou prováděná na příslušnou Krajskou hygienickou stanici a tvoří podklady pro zadání do Registru tuberkulózy, jehož nedílnou součástí je Informační systém bacilární tuberkulózy (ISBT). Vzájemným propojením systémů lze kontrolovat úplnost a validitu platných dat o TBC a NTM [ÚZIS ČR 2013].

### **1.3.1 Registr tuberkulózy (RT)**

RT zajišťuje pravidelný sběr údajů o nemocných TBC, které jsou analyzovány Národní jednotkou dohledu nad tuberkulózou (NJDT). Ta na základě těchto informací provádí kvalifikovanou analýzu epidemiologické situace TBC v ČR a vyhodnocuje účinnost antituberkulotické léčby [bulovka.cz 2013].

### 1.3.2 Informační systém bacilární tuberkulózy (ISBT)

Databázový systém ISBT slouží k zadávání, editaci i vyhodnocení dat zjištěných pozitivních výsledků na základě laboratorních vyšetření na území České republiky [www.trios.cz]. Povinnost hlásit pozitivní nálezy má každá laboratoř, která provádí detekci mykobakterií.

### 1.3.3 Epidemiologická situace v ČR

Česká republika se řadí k zemím s nízkým výskytem TB, situace je proto považována za stabilizovanou s klesající tendencí (viz graf 1).

Graf 1: Počet hlášených onemocnění TB v ČR v letech 2000 - 2012



V roce 2012 bylo celkem hlášeno 611 případů onemocnění TBC, tj. 5,8 / 100 000. Nově bylo registrováno 597 (98 %) nových případů - u mužů 392 (66 %) a 205 (34 %) u žen. Recidiv bylo oznámeno 14 (2 %) případů - u mužů 10 (71 %) a u žen 4 (29 %). Nejčastější formou onemocnění byla TBC dýchacího ústrojí (90 %). Nejvíce nemocných bylo evidováno u věkové kategorie nad 75 let. Na onemocnění zemřelo 22 lidí (3,6 %). Onemocnění NTM bylo celkově hlášeno ve 108 případech, tj. 1 / 100 000. Z celkového počtu - 105 (97 %) nově hlášených a 3 (3 %) recidivy [www.uzis.cz].

## **1.4 Laboratorní průkaz**

### **1.4.1 Bakteriologický průkaz**

Bakteriologický průkaz zahrnuje přímé mikroskopické a kultivační metody, které jsou v současné době stále považovány za „zlatý standard“.

#### **1.4.1.1 Odběr a transport materiálu**

Základ kvalitního laboratorního vyšetření spočívá již v preanalytické fázi. Jedná se především o správně provedený odběr a včasné dodání vzorku do laboratoře. K průkazu je možné použít jakýkoliv biologický materiál, s výjimkou krve. Nejčastěji se k průkazu infekce odebírá sputum, které se zasílá 3 dny za sebou, nejméně v množství 2 ml. Pokud pacient nevykašlává, je možno k indukci sputa použít 3% hypertonický roztok chloridu sodného (NaCl) nebo se provádí laryngeální výtěr. Mezi další odebírané vzorky patří: bronchiální sekret, bronchiální laváž, bronchiální výplach, výpotky (hrudní, kloubní), moč, punktát, likvor, hnis, bioptický a sekční materiál [Homolka et al. 2012]. Odběr se provádí do sterilní zkumavky, která musí být řádně uzavřena a označena dle požadavku laboratoře (příjmení, jméno, rodné číslo pacienta). Bioptický a sekční materiál nesmí být uložen do fixačního nebo konzervačního roztoku. Při provedení výtěru se použije suchý tampon bez transportní pudy. Do laboratoře je nutné vyšetřovaný materiál transportovat co nejdříve, maximálně do 24 hodin po odběru. Uchování, ale i transport se zajišťuje při 4 °C nebo při pokojové teplotě, v letním období v termoboxu. Materiál nesmí být vystaven přímému slunečnímu nebo UV záření [Kolektiv autorů 1998].

### 1.4.1.2 Příprava vzorku

Příprava a zpracování vzorku se provádí v několika základních krocích: dekontaminace, homogenizace, koncentrace a inokulace.

Velmi důležitým krokem při zpracování vyšetřovaného vzorku je dekontaminace (moření). U převážné části vzorků je totiž pravděpodobná přítomnost kontaminující (doprovodné) mikrobiální flóry, jejíž produkty by mohly způsobit potlačení růstu mykobakterií, a tím kultivaci znehodnotit. Výjimkou, kdy není potřeba dekontaminaci provést, tvoří vzorky, u kterých se předpokládá, že jsou primárně sterilní (likvor). Dekontaminačními látkami jsou zpravidla klasické anorganické kyseliny a zásady, které způsobují ztrátu životaschopnosti u více jak 90 % ostatních mikrobů [Bednář et al. 1996]. Homogenizací vzorku pomocí mechanického třepání v kombinaci s dekontaminačními látkami dochází k uvolnění mykobakterií z hleny. Centrifugací se docílí koncentrace maximálního počtu mykobakterií do nejmenšího možného objemu. K inokulaci se použije získaný sediment po slítí supernatantu [Kolektiv autorů 1998].

Dekontaminování průvodní mikroflóry lze provést několika možnými způsoby. Běžně používanými jsou metoda s N-acetyl-L-cysteinem (NALC), Petroffova metoda (modifikovaná) a metoda s laurylsulfátem sodným. Dekontaminační roztok pro metodu s NALC se připravuje přidáním 1M hydroxidu sodného (NaOH) a citrátu sodného ( $\text{Na}_3\text{citrát}$ ) v poměru 1:1 k NALC. K neutralizaci se používá fosfátový pufr. Základními činidly u Petroffovy metody je použití 1M NaOH s následnou neutralizací sterilní destilované vody. U metody s laurylsulfátem sodným se základní dekontaminační roztok připraví za tepla rozpuštěním čistého laurylsulfátu sodného v NaOH. K následné neutralizaci se používá sterilní destilovaná voda okyselená kyselinou chlorovodíkovou (HCl). Pro dekontaminaci laryngálních výtěrů je doporučeno postup v kombinaci 1M HCl a 2M NaOH a pro dekontaminace vzorků moči (alternativní) - působením 20% kyseliny sulfosalicylové a 4% kyseliny sírové ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) [Kolektiv autorů 1998].

### 1.4.1.3 Mikroskopický průkaz

Mikroskopie je základní vyšetřovací metodou přímého průkazu. Provádí se u většiny biologických vzorků, výjimku tvoří vyšetření moči. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu, kterou lze využít jak při vyhledávání nemocných osob, tak ale i zároveň ke kontrole účinnosti poskytované léčby [Kubín et al. 1986]. Rychlost průkazu je ve srovnání s kultivací výhodou. Citlivost této metody není vysoká, neboť průkaz pozitivního nálezu je závislý na počtu přítomných mikrobů. Je zapotřebí, aby v 1 mm<sup>3</sup> bylo alespoň 10<sup>5</sup> mikrobů [Bednář et al. 1996]. Nevýhodou je, že chybí možnost bližšího určení daného mykobakteria a posouzení jeho životaschopnosti. Vyšetření je proto pouze doplňující a nález je nutno ověřit kultivačně [Homolka et al. 2012]. K obarvení ART lze použít jednu ze dvou možných variant. Při hodnocení nátěru na přítomnost ART se prohlíží celá plocha meandrovitým způsobem a nedílnou součástí je určení kvantity, při kterém se udává počet přítomných ART na počet prohlížených polí [Kolektiv autorů 1998].

V laboratorní praxi je povinnost hlášení výsledku mikroskopického vyšetření a to nejpozději do 48 hodin od přijetí klinického materiálu. Mikroskopická pozitivita se oznamuje telefonicky, a to z důvodu klinického i epidemiologického, protože nejzávažnějším zdrojem nákazy jsou nemocní s nálezem ART. Zároveň je povinnost uchovávat pozitivní preparáty v uzavřené krabici po dobu 1 roku [Kolektiv autorů 1998].

#### 1.4.1.3.1 Barvení dle Ziehl-Neelsena

Klasickou metodou je barvení podle Ziehl-Neelsena (ZN) a spočívá v barvení za tepla. Zhotovený nátěr se barví karbolfuchsinem. Aby došlo k navázání barviva, je potřeba k roztoku přidat fenol (mořidlo). K odbarvení je možné použít 25% kyselinu sírovou (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) nebo kyselý alkohol. Nespecifické struktury se kontrastně dobarví použitím 1% vodného roztoku malachitové zeleně nebo 1% vodného roztoku methylenové modři [Kolektiv autorů 1998].



Prohlížení a zhodnocení preparátů na přítomnost ART se provádí ve světelném mikroskopu při celkovém zvětšení 1000× (okulár 10×, objektiv 100×) za použití imerzního oleje. ART se jeví jako červené tyčky (viz příloha 1). Pozadí je podle použitého odbarvovacího roztoku, a to buď zelené, nebo modré. Hodnocení kvantity (viz tab. 3) se provádí v 50 zorných polích [Kolektiv autorů 1998].

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

Tab. 3: Hodnocení nálezu (barvení dle Ziehl-Neelsena) Zdroj: Kolektiv autorů 1998

#### 1.4.1.3.2 Fluorescenční barvení

Další možnou variantou je barvení pomocí fluorochromů - fluorescenční barvení. Směs fluorochromů je vodný roztok auraminu O a rhodaminu. Je nutné ho uchovávat v tmavých lahvích a jeho kvalita je především závislá na kvalitě použitého auraminu O. K odbarvení se používá roztok chloridu sodného s koncentrovanou HCl a 96% alkoholu. K dobarvení pozadí se používá vodný roztok manganistanu draselného nebo kyselého fuchsínu v HCl [Kolektiv autorů 1998].

Pro zhodnocení mikroskopického obrazu je zapotřebí speciálního mikroskopu se zdrojem UV záření - fluorescenčního mikroskopu. UV záření vyvolává u zbarvených mykobakterií sekundární fluoreskující viditelné záření [Bednář et al. 1996]. ART se proto jeví jako zářící žlutozelené až stříbrné tyčinky na tmavém podkladu. Hodnocení se provádí při celkovém zvětšení 200 - 400× (okulár 10×, objektiv 20 - 40×) bez použití imerzního oleje. Při prvním zachytu ART se doporučuje použít k ověření morfologie tyček imerzní olej. Následně se hodnotí při celkovém zvětšení 1000× (okulár 10×, objektiv 100×). Je nutné, aby se použil speciální imerzní olej, jehož index lomu je

1,515. Hodnocení kvantity (viz tab. 4) se provádí v 25 zorných polích [Kolektiv autorů 1998].

Hodnocení	Nález
0	ART nenalezeny (nebo nalezeny 1 - 4)
+	ojedinělé ART
++	početné ART
+++	velmi početné ART

Tab. 4: Hodnocení nálezu (fluorescenční mikroskopie) Zdroj: Kolektiv autorů 1998

Fluorescenční barvení je oproti barvicí metodě dle ZN mnohem citlivější, proto je vhodné ho využít k hodnocení nátěru z vyšetřovaného vzorku. Při kontrole narostlých kultur se naopak doporučuje použít metodu dle ZN, neboť ta vykazuje mnohem větší specifitu v morfologii ART. Napomáhá tak odlišit tuberkulózní mykobakterie od netuberkulózních [Homolka et al. 2012].

#### **1.4.1.4 Kultivační průkaz**

##### **1.4.1.4.1 Kultivace na půdách**

Ke klasickému kultivačnímu průkazu se používají pevné vaječné půdy, které se doplňují půdami tekutými. Základní používanou půdou je vaječná půda Löwenstein-Jensenova (LJ) (viz příloha 2a). Další variantou je půda podle Ogawy (Ogawa) (viz příloha 2b). Tekutou kultivační půdou je Šulova půda (viz příloha 2c). Doporučuje se použít paralelně alespoň 3-4 půd různého složení. Kombinací kultivačních médií se tak umožní možnost zvýšení pravděpodobnosti záchytu mykobakterií z vyšetřovaného klinického materiálu. LJ půdu je vhodné doplnit vaječnou půdou Ogawa, která je citlivější [Bednář et al. 1996].

Teplotní optimum pro kultivaci je u většiny mykobakteriálních druhů 37 °C. Komorový termostat (viz příloha 2d), ve kterém se inokulované půdy inkubují, by měl být vybaven jističem, aby nedošlo k překročení teplotního maxima 40 °C. Zároveň je

nutné zajistit cirkulaci teplého vzduchu a relativní vlhkost na 80 - 85 % [Kolektiv autorů 1998]. Pro kultivaci některých mykobakteriálních kmenů se teplota inkubátoru upravuje na nižší (25 °C, 30 °C) nebo vyšší (42 °C) teplotu [Bednář et al. 1996]. Úprava se zpravidla provádí pro vzorky, v nichž je možnost záchytu podmíněně patogenních kmenů, jako např. *M. marinum* nebo *M. chelonae* (způsobují kožní a podkožní granulomy a abscesy) [Kubín et al. 1986].

Vzhledem k tomu, že mykobakteriální kmeny vykazují pomalý růstový cyklus, k vytvoření makrokolonií, které lze v primokultuře pozorovat, nutné alespoň 2 týdnů inkubace. I u rychle rostoucích druhů je zapotřebí alespoň 7 denní kultivace. Pokud byly ART detekovány již přímou mikroskopií, lze růst kultury předpokládat již po 3 týdnech inkubace. Hodnocení výsledku inkubace se v laboratoři standardně provádí po 3, 6 a 9 týdnech. Výsledek se hodnotí kvantitativně (viz tab. 5) a pozitivita narostlé kultury se ověřuje v nátěru barveném dle ZN [Kubín et al. 1986].

Hodnocení	Nález
Negativní	kolonie nenalezeny
1 - 9	ojedinelé kolonie (uvádí se jejich počet)
+	10 - 20 kolonií
++	20 - 100 kolonií
+++	nepočítatelný počet kolonií (splývající růst)

Tab. 5: Hodnocení pozitivních kultur

Zdroj: Kolektiv autorů 1998

Hodnocení se zaměřuje na makroskopický vzhled kultivačních médií. Pokud je pevná vaječná půda bez přítomnosti jakýchkoliv kolonií, a to jak na povrchu, tak v kondenzní vodě a tekutá půda je čirá, bez zákalu, nález se hodnotí jako negativní. V případě nárůstu se hodnotí fenotypové - růstové i morfologické vlastnosti (vzhled, velikost, tvar, pigmentace), které jsou důležité pro následnou druhovou identifikaci. Při identifikaci druhu se stanovují produkty metabolismu mykobakterií. Fenotypové znaky jsou pro jednotlivé mykobakteriální charakteristické [Bednář et al. 1996].

#### 1.4.1.4.2 Kultivace v automatickém detekčním systému

V současné době se již standardně v kombinaci s kultivací na pevných vaječných půdách využívají automatické detekční systémy. Slouží k rychlé detekci velké škály mykobakteriálních kultur *in vitro*. Výjimku tvoří detekce vzorků krve. Principem metod je stanovení metabolických produktů mykobakterií v tekutém prostředí. Mezi nejběžněji užívané automatické detekční systémy patří BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) a BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Inc., Durham, NC) [Kolektiv autorů 1998, Murray et al. 2007]. Tyto systémy ve srovnání s kultivací na pevných půdách značně urychlují diagnostiku, a tím i následnou identifikaci a zhotovení citlivosti [Piersimoni et al. 2001].

Kultivace v automatickém detekčním systému BacT/ALERT® 3D (viz příloha 3a) je založena na detekci oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>), který je rozpuštěn v kultivačním médiu a k jeho aktivnímu uvolňování dochází tím, jak mikroorganismy metabolizují substráty. Zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> tak snižuje pH v tekutém kultivačním médiu, a tím dochází ke změně barvy kolorimetrického senzoru na dně kultivační lahvičky. Přibližný počet jednotek, které jsou detekovány, je 10<sup>6</sup> až 10<sup>7</sup> CFU/ml. Tekuté médium v kultivační lahvičce BacT/ALERT® MP (viz příloha 3b) o obsahu 10 ml se skládá z Middlebrook 7H9, pankreaticky natráveného kaseinu, hovězího sérového albuminu a katalázy v purifikované vodě. Před vlastní inokulací se do kultivační lahvičky ještě přidává antibiotický doplněk - MB/BacT® Antibiotic Supplement (amfotericin B, azlocillin, kyselina nalidixová, polymyxin B, trimetoprim, vankomycin) určený k potlačení růstu případné kontaminující flóry [bioMérieux 2008].

Automatický detekční systém BACTEC™ MGIT™ 960 (viz příloha 4a) je přístroj využívající neinvazivní neradiometrickou fluorescenční technologii. Během kultivační doby se v 60 minutovém intervalu monitoruje nárůst fluorescence, který je způsoben spotřebou kyslíku aerobních mikroorganismů. Životaschopné mikroorganismy, které jsou ve vzorcích přítomné, metabolizují živiny a kyslík v kultuře. Hodnota fluorescence je závislá a přímo úměrná množství mikroorganismy spotřebovaného kyslíku. K signalizaci pozitivního nálezu dochází v okamžiku, kdy je v kultivační zkumavce

přibližně v počtu  $10^5$  až  $10^6$  CFU/ml [Becton, Dickinson and Company 2004]. Zkumavka BBL™ MGIT™ 7 ml (viz příloha 4b) se šroubovacím polypropylenovým uzávěrem určená ke kultivaci obsahuje 7 ml upraveného základního tekutého živného média Middlebrook 7H9. Dále 110 µl fluorescenčního ukazatele, který je zalitý v základu ze silikonové pryže v kulatém dnu a je vyplněna 10% CO<sub>2</sub>. Fluorescenční sloučenina je vysoce citlivá na přítomnost kyslíku v tekutém živném médiu. Do zkumavky BBL MGIT se před inokulací přidává směs antimikrobiálních látek BACTEC™ MGIT™ PANTA (PANTA). Směs obsahuje antimikrobiální látky, které snižují možnost kontaminace ve složení: polymyxin B, amfotericin B, kyselina nalidixová, trimetoprim a azlocillin. Zkumavky se používají i pro kultivaci při 30 °C nebo 42 °C. K inkubaci však nelze však použít automatický detekční systém. Zkumavky se vkládají do klasického inkubátoru a odečet nárůstu mikroorganismů je nutné provést ručně [Becton, Dickinson and Company 2011].

#### **1.4.1.5 Druhov<sup>á</sup> identifikace**

Cílem screeningových metod, které se vždy provádějí u každého nově izolovaného kmene je odlišení druhů obligátně patogenních od podmíněně patogenních nebo saprofytických [Kolektiv autorů 1998]. Identifikace jednotlivých izolátů se zakládá na průkazu druhově charakteristických genotypicky fixovaných růstových, morfologických i metabolických znaků [Bednář et al. 1996]. V současné době jsou často k rychlé identifikaci využívány molekulárně - genetické metody.

##### **1.4.1.5.1 Základní fenotypové metody**

Základními fenotypovými znaky jsou, které jsou u izolovaných kmenů hodnoceny - morfologie ART, morfologie a pigmentace kolonií, biochemické znaky (viz tab. 6).

#### Morfologie ART:

- mikroskopické ověření acidorezistence a morfologické (velikost, uspořádání tyček, tvorba provazců hodnocení mykobakteriálních kultur (viz příloha 5).

#### Morfologie a pigmentace kolonií:

- na pevných půdách se hodnotí růst, velikost, pigmentace, povrch a tvar kolonií a na půdách tekutých se hodnotí tvorba blanky, růst v sedimentu, zákal, pigmentace. Bohatý růst se označuje jako eugonický a špatný jako dysgonický. Hodnocení růstu pro jednotlivé kolonie se označuje: typ „R“ (z angl. „*rough*“ - drsný) nebo typ „S“ (z angl. „*smooth*“ - jemný, hebký) [Šula 1965]. Na pevných půdách jsou kolonie typu R rozmanitého tvaru. Jsou to neprůhledné, hrudkovité (květákovité, bradavčité; viz příloha 6a, 6b) nebo dobře vyvinuté ploché kolonie. Povrch mají nerovný a drsný. Okraje bývají nepravidelné. Konzistence kolonií je suchá, drobná, nebo mazlavá. Některé mají podobu stříšky a uvnitř jsou prázdné. Jiné mohou být vypouklé nebo ve středu vpáčené, pupkovité, ve tvaru věnečků. Kolonie typu S jsou různé pigmentace a velikosti. V tekutých půdách se může na povrchu tvořit suchá blanka (viz příloha 7a). Sediment je granulovaný (zrníčkovitý; viz příloha 7b), který je neroztřepatelný (viz příloha 7c). Může být i jemný, po roztřepání vzniká mléčný zákal. Podle barvy pigmentu se kolonie označují jako *nonchromogeny*, *skotochromogeny*, *fotochromogeny* [Šula 1965, Votava et al. 2010].

#### Biochemické znaky:

růst při různých teplotách (25 °C, 37 °C, 30 °C, 42 °C), redukce nitrátů (při enzymatické reakci je redukován dusičnan na dusitan), niacinový test (kyselina nikotinová tvoří s kyanidy deriváty), test fotochromogenity (závislost pigmentace na světle), hydrolýza Tweenu 80 (enzymatickou hydrolýzou dochází k odštěpení kyseliny olejové z Tweenu), tvorba ureázy, citlivost na TCH (hydrazin kyseliny thiofen-2-karbonové) [Kolektiv autorů 1998].

Znaky	Tvorba provazců	R - kolonie	Pigment ve tmě	Fotochromogenita	25 °C	42 °C	TCH	Redukce nitrátu	Tween 80	Ureáza
<i>M. tuberculosis</i>	100	100	0	0	0	0	100	100	14	100
<i>M. bovis</i>	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>M. bovis BCG</i>	100	100	0	0	0	0	0	20	0	100
<i>M. avium</i>	0	0	0	0	80	100	100	0	0	0
<i>M. intracellulare</i>	0	0	0	0	80	100	100	0	0	0
<i>M. fortuitum</i>	/	/	0	/	/	/	/	100	21	/
<i>M. kansasii</i>	95	0	0	100	100	75	100	100	100	100
<i>M. xenopi</i>	0	0	100	0	0	100	100	0	0	0
<i>M. marinum</i>	0	0	0	100	100	0	100	16	23	100

Tab. 6: Hodnocení - fenotypové znaky

Zdroj: Kolektiv autorů 1998

#### 1.4.1.5.2 Imunochromatografický test

Jednoduchá a rychlá identifikace komplexu *Mycobacterium tuberculosis* v tekuté kultuře ze zkumavky BBL™ MGIT™ 7 ml se provádí konfirmačním imunochromatografickým testem - BD MGIT™ TBC Identification Test (TBc ID). Principem sendvičového testu je vazba antigenu MPT64 (mykobakteriální protein) s monoklonální protilátkou anti-MPT64 a s následnou vazbou na druhovou specifickou sekundární protilátku (anti-MPT64). Testování lze provést i v případě, jedná-li se o směs tuberkulózních a netuberkulózních kultur [Becton, Dickinson and Company 2009]. Antigen je ve významném množství vylučován již v počátečním období kultivace a s delší kultivací klesá [Nagai et al. 1991]. Ve srovnání se základními biochemickými testy (např. redukce nitrátů, niacinový testy) vykazuje tento test, snadné použití, 98,8% senzitivitu a 100% specificitu. Proto je vhodnou alternativou používaných základním biochemických testů [Yu MC et al 2011].

#### 1.4.1.5.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF

Hmotnostní spektrometrie je poměrně novou technologií pro rutinní druhovou identifikaci bakteriálních mikroorganismů. Ve srovnání s konvenčními fenotypovými identifikačními metodami umožňuje tato analytická metoda snadnější a rychlejší diagnostiku pozitivních kultur [García et al. 2012]. Je založena na principu rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém poli. Pro stanovení vzorků s vyšší molekulovou hmotností (rozmezí 100 Da až 100 kDa) se používá MALDI TOF hmotnostní spektrometrie. Přístroje založené na principu hmotnostní spektrometrie zastupují převážně analyzátoři Biotyper (Bruker Daltonics, Německo) nebo VITEK MS (bioMérieux, Francie). Využívá se ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight) [Belkum et al. 2012].

#### 1.4.1.5.4 Molekulárně - genetické metody

V poslední době se často k identifikaci mykobakteriálních kmenů z pevných i tekutých médií užívají molekulárně-genetické metody [Votava et al. 2010]. V současné době je k dispozici řada diagnostických souprav. Jedná se o stripové techniky, kterými lze detekovat i slabě pozitivní a smíšené kultury. Výsledky se získají již v průběhu 5 hodin, což je velkým přínosem v porovnání s konvenčními metodami. Základem testu INNO-LiPA (Innogenetics, Zwijnaarde, Belgie) je k získání DNA amplifikace 16S - 23S rRNA genomu. Test je určen k identifikaci 17 nejčastěji detekovaných mykobakteriálních druhů. Senzitivita identifikačních testů je 100% a specifita 94,4% [Suffys et al. 2001]. Obdobnou variantou stripové metody je GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Nehren, Německo). K identifikaci komplexu *Mycobacterium tuberculosis* a 24 nejčastějších NTM se používá GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM (např. *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*). Pokud není identifikace mykobakteriálního kmene úspěšná v prvním kroku, provádí se následně identifikace pomocí GenoType<sup>®</sup>



Mycobacterium AS, která umožňuje identifikaci dalších 19 NTM druhů (např. *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*) [Richter et al. 2006].

#### 1.4.1.6 Léková citlivost

Nedílnou součástí laboratorního průkazu je i testování citlivosti na účinnost antituberkulotika. Provádí u každého nově zjištěného kmene, a to především u kmenů *M. tuberculosis*. U NTM druhů se vyšetření citlivosti konzultuje s ošetřujícím lékařem [Homolka et al. 2012].

Velkým problémem současné doby je rezistence vůči antituberkulotikům (ATT) a šíření multirezistentních i vysoce rezistentních kmenů *M. tuberculosis*. Multirezistentní kmeny (MDR = multi drug resistant) jsou označovány ty kmeny, které vykazují rezistenci minimálně vůči isoniazidu a rifampicinu. Kmeny, které se označují jako vysoce rezistentní nebo též extrémně rezistentní (XDR = extensively drug resistant) jsou rezistentní na isoniazid, rifampicin, fluorochinolony (ciprofloxacin, ofloxacin) a dále minimálně na jeden ze tří léků druhé volby, který je aplikován injekčně (amikacin, kanamycin, capreomycin) [Stoffels et al. 2013]. V roce 2009 byla diagnostikována další rezistentní forma - TDR (TDR = total drug resistant), která vykazuje rezistenci na všechny ATT první a druhé řady [Bártů 2010].

V první linii se testuje 5 základních preparátů: streptomycin (STM, S), isoniazid (INH, I), rifampicin (RMP, R), etambutol (EMB, E), pyrazinamid (PZA, P). V případě zjištěné rezistence se ve druhé linii provádí testování:  $\rho$ -aminosalicylová kyselina (PAS), cykloserin (CS), etionamid (ETA), kanamycin (KANA), amikacin (AMI), rifabutin (RFB), ciprofloxacin (CIP), ofloxacin (OFLO), azitromycin (AZI), claritromycin (CLA), clofazimin (CLO), capreomycin (CAP) [Votava et al. 2010].

##### 1.4.1.6.1 Proporční metoda dle Canettiho

Proporční metodou dle Canettiho se provádí stanovení lékové citlivosti na základní řadu (1. linii) ATT. Tento způsob testování je v podstatě nepřímý test, při kterém se

srovnává počet narostlých kolonií na půdě s kritickou koncentrací léku s počtem narostlých kolonií ve stejném ředění na půdě kontrolní. Doba inkubace při optimální teplotě trvá obvykle 3 týdny. V případě potřeby z důvodu nedostatečně vyrostlé kultury se prodlužuje o další 1 - 2 týdny. Pokud je prokázána rezistence k ATT, provádí se stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) mikrodiluční metodou na 2. linii ATT [Kolektiv autorů 1998, Votava et al. 2003].

#### **1.4.1.6.2 Automatické detekční systémy**

K testování citlivosti lze využít i automatické detekční systémy, které oproti klasické metodě značně vyšetření urychlují (7 - 10 dní). K vyšetření lze použít narostlé kultury z pevné i tekuté půdy [Garrigó et al. 2007, Havelková et al. 2003].

#### **1.4.2 Molekulárně - genetický průkaz**

K přímému průkazu *Mycobacterium tuberculosis* se využívá rychlá a specifická metoda - polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. „*Polymerase Chain Reaction*“) k průkazu DNA nebo amplifikaci 16S rRNA [Votava et al. 2010].

K amplifikaci určité části DNA se používají krátké úseky DNA, jejichž sekvence je známa. Nazývají se primery. Cílové sekvence, s nimiž primery hybridizují musí být specifické jen pro tu příslušnou oblast, která se bude amplifikovat a nevyskytují se na jiných místech DNA [Kočárek 2007]. Pro *Mycobacterium tuberculosis* je specifická sekvence IS6110 [Alli et al. 2011]. Výsledkem procesu je mnohonásobné zmnožení vybraného testovaného úseku DNA. Produkty PCR se nazývají amplikony [Šmarda et al. 2005]. Jsou obvykle o velikosti desítky až tisíce bp a jsou analogické restriční fragmentům. Prokazují se stanovením jejich velikosti pomocí elektroforézy v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. V současné době se stále častěji používá metoda real-time PCR, která umožňuje měření nárůstu koncentrace amplifikovaného produktu v průběhu PCR. K detekci produktu se používají fluorescenční sondy [Espy et al. 2006].

### 1.4.3 Imunologický průkaz

Metodami nepřímého průkazu jsou diagnostické *in vitro* testy. V současné době jsou komerčně dostupné QuantiFERON<sup>®</sup>TB Gold (QFT-G) a QuantiFERON<sup>®</sup>TB Gold In-Tube (QFT-GIT) od firmy Cellestis International nebo T-SPOT.TB od firmy Oxford Immunotec. Testy jsou určeny k nepřímé diagnostice *Mycobacterium tuberculosis* a jsou schopny odlišit imunitní odpověď postinfekční a postvakcinační.

Základem testů je stimulace efektorových buněk (Th1 lymfocytů) pomocí TB-specifických rekombinantních antigenů ESAT-6, CFP-10 a TB7.7, které jsou charakteristické pro *Mycobacterium tuberculosis* [Powell et al. 2011]. Nevyskytují se přitom u BCG vakcíny a ani u většiny netuberkulózních mykobakterií. Výjimku tvoří *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum* [Homolka et al. 2012]. Stanovení koncentrace INF- $\gamma$  produkovaného specifickými T-lymfocyty se u QFT-G a QFT-GIT provádí pomocí sérologického testu založeného na principu ELISA (enzymová imunoanalýza). Pro interpretaci jsou definované „cut-off“ hranice (0,35 IU/ml). Ta ale musí být uvážena, aby se zabránilo chybné diagnóze. V případě potřeby se vyšetření opakuje odebráním nového vzorku [Powell et al. 2011]. U testu T-SPOT.TB se hodnocení koncentrace uvolněného INF- $\gamma$  odečítá ve formě spotů [Connell et al. 2008].

## 2. Cíl práce

1. Porovnání a ověření účinnosti dekontaminačních metod, které jsou nezbytnou součástí bakteriologického průkazu. Použita byla metoda s kyselinou chlorovodíkovou (metoda s HCl) a metoda s N-acetyl-L-cysteinem (metoda s NALC).

2. Porovnání výtěžnosti a hodnocení doby detekce u používaných kultivačních metod. Porovnány byly konvenční kultivační média (klasická kultivace: LJ a Ogawa) a automatický detekční systém BACTEC<sup>TM</sup> MGIT<sup>TM</sup> 960.

3. Zpracování přehledu četnosti izolovaných mykobakteriálních kmenů v laboratoři Nemocnice Č. Budějovice, a.s. za období 2010 - 2012 dle věku pacienta a původce onemocnění.

## 3. Metodika

### 3.1 Materiál a metody

V období 1.1. - 6.6. 2013 jsem v Nemocnici České Budějovice, a. s. v Centrálních laboratořích v Laboratoři lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie (PBAK) prováděla zpracování zasláného materiálu se specifikací požadavku vyšetření: průkaz mykobakterií nebo průkaz BK. Vzhledem k tomu, že infekční onemocnění ve většině případů postihuje dýchací ústrojí, použila jsem pro zhodnocení výsledků své studie data získaná z vyšetřovaných sput. V daném období bylo celkově vyšetřeno 400 sput. Převážná část vzorků byla zaslána z oddělení, jejichž specializace se zaměřuje na dýchací ústrojí. Z Plicní léčebny (léčebna TRN) 206 vzorků (52%), z ambulantního plicního oddělení (poliklinika TBC) 120 vzorků (30 %) a z lůžkového plicního oddělení (lůžka TRN) 59 vzorků (15 %). Menší procento (3 %) tvoří vzorky, které jsou zaslány z ostatních nemocničních (lůžka ne TBC) a ambulantních oddělení (poliklinika ne TBC) (viz tab. 7).

Tab. 7: Přehled zasláných sput z jednotlivých oddělení

<b>Oddělení</b>	<b>celkem (vzorků)</b>
poliklinika ne TBC	2 (-1 %)
lůžka ne TBC	13 (3 %)
léčebna TRN	206 (52 %)
lůžka TRN	59 (15 %)
poliklinika TBC	120 (30 %)
<b>Celkem</b>	<b>400</b>

Všechny zasláné vzorky byly zpracovávány dle jednotlivých kroků příslušných pro danou metodu (viz Pracovní postupy). Základním krokem při zpracování je dekontaminace vzorku. Porovnávána a ověřována byla metoda s HCl a metoda s NALC. Dekontaminační metoda s NALC je doporučována výrobcem pro automatický systém

BACTEC™ MGIT™ 960 (BACTEC MGIT), který byl na začátku roku v laboratoři PBAK uveden do provozu. Všechny zpracované vzorky byly poté paralelně kultivovány v kombinaci konvenčního způsobu na pevných vaječných půdách (klasická kultivace) s kultivací v automatickém detekčním systému BACTEC MGIT. Pro klasickou kultivaci jsem použila kombinaci 1 půdy LJ a 1 půdy Ogawa. Pevné půdy jsou složeny ze směsi homogenizované vaječné masy, minerálních solí, asparaginu a glycerinu. K této směsi se přidává rozpustný škrob podle Sørensen, 2% vodný roztok malachitové zeleně a destilovaná H<sub>2</sub>O. Pro automatický detekční systém BACTEC MGIT jsem použila zkumavku BBL™ MGIT™ 7 ml (BBL MGIT), která obsahuje 7 ml Middlebrookova 7H9 média, která byla doplněna suplementem s obsahem antimikrobiálních látek BBL™ MGIT™ PANTA™ (PANTA: polymyxin B, amfotericin B, kyselina nalidixová, trimetoprim, azlocillin). Inokulované půdy LJ a Ogawa jsem vložila do termostatu, kde byly inkubovány při 37 °C po dobu 63 dní. Hodnocení bylo provedeno dle standardní metodiky 3, 6 a 9 týden. Zkumavky BBL MGIT jsem vložila do přístroje s nastavenou dobou inkubace na 42 dní s nepřetržitou detekcí. Z každého zpracovaného vzorku byl zároveň zhotoven nátěr pro vyšetření přímou mikroskopií barvený fluorescenční metodou. Zhotovuje se vždy na nové podložní sklíčko, jež je zbavené mastnoty a z důvodů archivace se označení protokolárním číslem provádí vyrytím diamantovou tužkou. Pozitivita nálezu u obou kultivačních metod byla vždy mikroskopicky ověřena. K obarvení byla použita metoda dle ZN. V případě positivity zkumavek z BACTEC MGIT se navíc provádí subkultivace, neboť ve zkumavce BBL MGIT nelze hodnotit morfologické znaky. Pro tento postup se používá Ogawa a Šulova půda, která se skládá z minerálních solí, hovězího séra, glycerinu, 2% vodného roztoku malachitové zeleně a destilované H<sub>2</sub>O. Druhovú identifikaci každého nově izolovaného mykobakteriálního kmene byla provedena v Laboratoři lékařské molekulární biologie a genetiky za použití stripové metody GenoType® Mycobacterium CM /AS.

## **3.2 Vybavení, kultivační média, reagenty, pomůcky**

Vybavení laboratoře:

- box laminární (Jouan, Francie), termostat EB-1000 (Jouan, Francie), centrifuga Rotina 46 (Hettich, SRN), BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson and Company, USA), třepačka, fluorescenční mikroskop (Olympus), světelný mikroskop (Olympus).

Kultivační média:

- půda Löwenstein-Jensenova, půda podle Ogawy, Šulova půda - (Trios s.r.o.); zkumavka BBL™ MGIT™ 7 ml (Becton, Dickinson and Company, USA).

Reagenty:

- BD BACTEC™ MGIT™ 960 Supplement Kit (BD BACTEC™ MGIT™ Growth Supplement, BD BBL™ MGIT™ PANTA™), 1 M HCl, 2 M NaOH, 4% NaOH, 2,9% Na<sub>3</sub>citrát, NALC, fosfátový pufr (pH 6,8), fyziologický roztok, roztoky pro fluorescenční barvení, roztoky pro barvení dle ZN.

Pomůcky:

- dávkovač, plastová Pasteurova pipeta, podložní skříčko, diamantová tužka.

## **3.3 Pracovní postupy**

### **3.3.1 Dekontaminační metoda s HCl**

1. Přidat 7 ml 1M HCl ke vzorku, intenzivně promíchat (Vortex).
2. Homogenizovat 20 minut v třepačce.
3. Přidat 4 ml 2M NaOH, intenzivně promíchat (Vortex).
4. Centrifugovat 20 minut při 3000 g.
5. Slít supernatant do odpadní nádoby s desinfekčním přípravkem.
6. Resuspendovat sediment 1,5 ml fyziologického roztoku.
7. Inokulovat resuspendovaný sediment: 0,5 ml BBL MGIT, 0,5 ml LJ, 0,5 ml Ogawa.
8. Zhotovit preparát (fluorescenční barvení).

### **3.3.2 Dekontaminační metoda s NALC**

1. Přidat 2 - 3 ml dekontaminačního roztoku ke vzorku, intenzivně promíchat (Vortex).  
Příprava roztoku: každý den nový, smícháním (1 : 1) 25 ml 4% NaOH a 25 ml 2,9% Na<sub>3</sub>citrátu s přidáním 0,125 g NALC.
2. Homogenizovat 15 minut v třepačce.
3. Přidat 25 ml fosfátového pufru, promíchat.
4. Centrifugovat 20 minut při 3000 g.
5. Slít supernatant do odpadní nádoby s desinfekčním přípravkem.
6. Resuspendovat sediment 1,5 ml fyziologického roztoku.
7. Inokulovat resuspendovaný sediment: 0,5 ml BBL MGIT; 0,5 ml LJ; 0,5 ml Ogawa.
8. Zhotovit preparát (fluorescenční barvení).

### **3.3.3 Kultivace: vaječné půdy LJ a Ogawa**

1. Temperovat zkumavku LJ a Ogawa při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
2. Inokulovat resuspendovaný sediment: 0,5 ml LJ a Ogawa s následným přelitím klínu.
3. Vložit do inkubátoru na dobu 63 dní při teplotě 37 °C (označit datum odečtu).

### **3.3.4 Kultivace: automatický detekční systém BACTEC™ MGIT™ 960**

1. Temperovat zkumavku BBL MGIT při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
2. Přidat do zkumavky 800 µl směsi PANTA. Příprava: 15 ml růstového přídatku BD BACTEC™ MGIT™ Growth Supplement do antibiotického lyofilizátu PANTA.  
Expirace: 5 dní při teplotě 2-8 °C.
3. Inokulovat resuspendovaný sediment: 0,5 ml do BBL MGIT.
4. Vložit do přístroje BACTEC MGIT na dobu 42 dní při teplotě 37 °C.



### **3.3.5 Fluorescenční barvení (nativní nátěr)**

1. Nátěry dokonale usušené a vyzářené pod UV světlem se fixují po dobu 10 minut při 105 °C v horkovzdušném sterilizátoru.
2. Barvit roztokem fluorochromů (auramin a rhodamin) po dobu 15 minut v kyvetě.
3. Slít roztok a opatrně opláchnout vodou.
4. Odbarvit kyselým alkoholem po dobu 5 minut
5. Slít roztok a opatrně opláchnout vodou.
6. Dobarvit roztokem Evansovy modři po dobu 4 minut.
7. Slít roztok, opatrně opláchnout vodou a sušit.
8. Prohlížet ve fluorescenčním mikroskopu. Nález ART se kvantitativně hodnotí ve 25 zorných polích.

### **3.3.6 Barvení dle ZN (ověření narostlé kultury)**

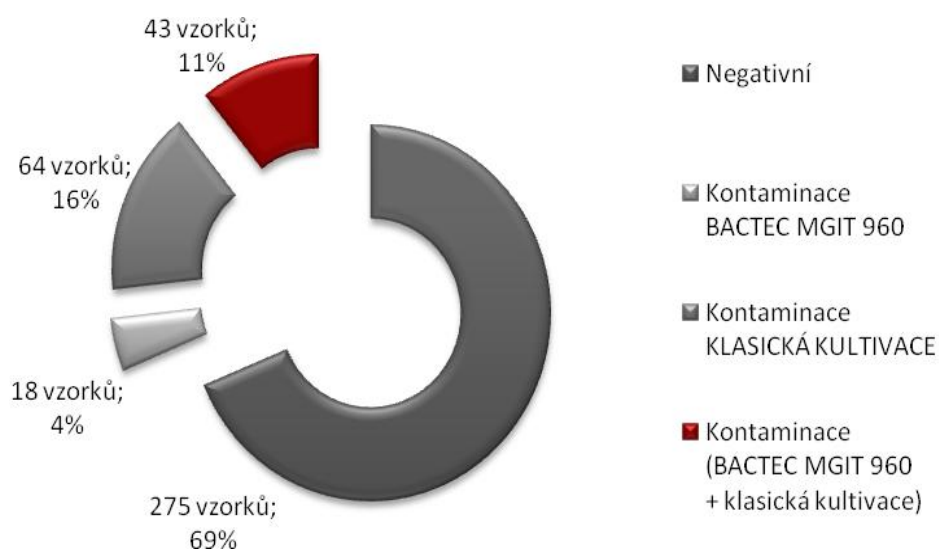
1. Nátěry dokonale usušené a vyzářené pod UV světlem se fixují protáhnutím v plameni nebo po dobu 10 minut při 105° C v horkovzdušném sterilizátoru.
2. Podložní sklíčko položené na stojánku překrýt filtračním papírem a převrstvit karbolfuchsinem na dobu 5 minut. Plamen zahřívat shora, dokud není filtrační papír vysušený, poté odstranit.
3. Opatrně opláchnout vodou.
4. Odbarvit kyselým alkoholem tak dlouho, dokud odtéká barvivo, přibližně 2 – 3 krát. V průběhu opláchnout vodou.
5. Dobarvit 1% roztokem vodného roztoku malachitové zeleně po dobu 20 - 60 sekund.
6. Opatrně opláchnout vodou a usušit.
7. Prohlížet ve světelném mikroskopu. Nález ART se kvantitativně hodnotí v 50 zorných polích.

## 4. Výsledky

### 4.1 Porovnání a ověření účinnosti dekontaminačních metod

Z celkového množství zpracovaných vzorků (400) bylo 69 % vzorků negativních. 11 % vzorků bylo kontaminováno v klasické kultivaci i v BACTEC MGIT, 16 % pouze v klasické kultivaci, 4 % vzorků pouze v BACTEC MGIT (viz graf 2).

Graf 2: Počet a procentuální vyjádření celkového počtu negativních a kontaminovaných vzorků



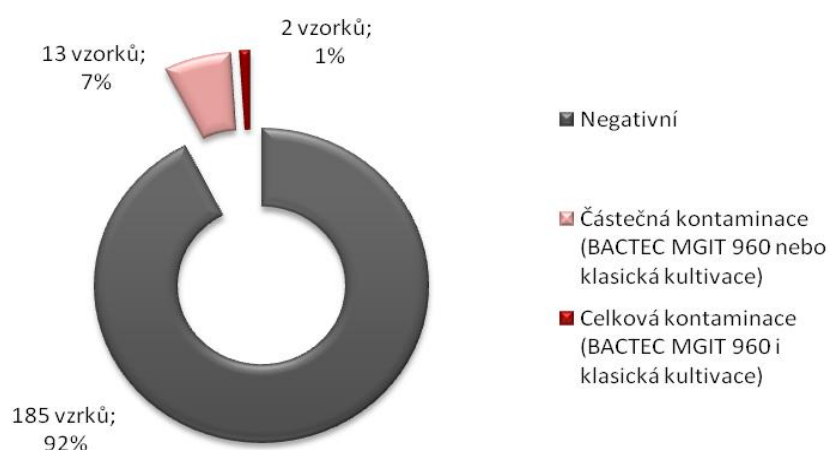
### 4.1.1 Hodnocení účinnosti metody s HCl

Z celkového počtu 200 vzorků bylo 185 (92 %) negativních. Kontaminace pak byla zaznamenána u 15 vzorků (8 %), z toho v BACTEC MGIT u 7 (4 %) vzorků v klasické kultivaci a u 2 (1 % vzorků) v obou metodách (viz tab. 8). U 13 vzorků byla kontaminace v jedné z použitých metod. U výše zmíněných 2 vzorků byla kultivace znehodnocena jak v BACTEC MGIT, tak v klasické kultivaci (viz graf 3). Celkem byla kontaminace v BACTEC MGIT u 9 (5 %) a v klasické kultivaci u 8 (4 %) vzorků.

Tab 8: Počet negativních a kontaminovaných nálezů v BACTEC MGIT a klasické kultivaci u metody s HCl

Hodnocení Metoda	Negativní	Kontaminace		
		BACTEC MGIT + klasická kultivace	Pouze BACTEC MGIT	Pouze klasická kultivace
metoda s HCl	185 (92 %)	2 (1 %)	7 (4 %)	6 (3 %)

Graf 3: Počet a procentuální vyjádření hodnocených vzorků u metody s HCl



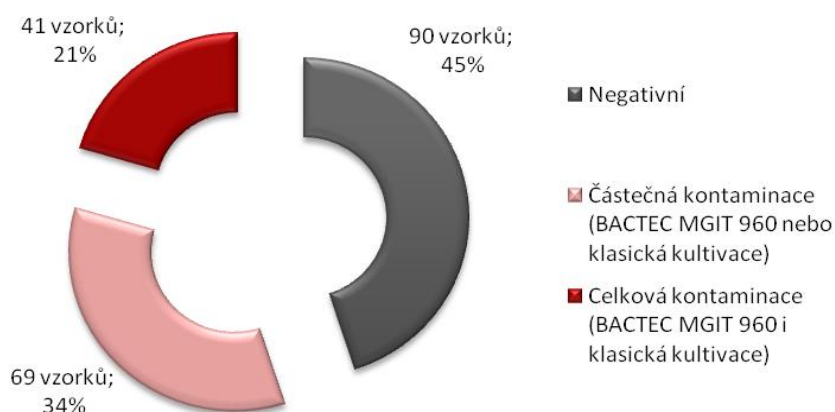
#### 4.1.2 Hodnocení účinnosti metody s NALC

Z celkového počtu 200 vzorků bylo 90 (45 %) negativních. Kontaminace pak byla zaznamenána u 110 (55 %) vzorků, z toho v BACTEC MGIT u 11 (5 %) vzorků a v klasické kultivaci u 58 (29 %) vzorků. V obou metodách u 41 (21 %) vzorků (viz tab. 9). U 69 (34 %) vzorků byla kultivace zachována alespoň v jedné z použitých metod. Kontaminace v BACTEC MGIT i v klasické kultivaci byla u 41 vzorků (viz graf 4). Celkem byla kontaminace v BACTEC MGIT u 52 (26 %) a v klasické kultivaci u 99 (50 %) vzorků.

Tab 9: Počet negativních a kontaminovaných nálezů v BACTEC MGIT a klasické kultivaci u metody s NALC

Hodnocení Metoda	Negativní	Kontaminace		
		BACTEC MGIT + klasická kultivace	Pouze BACTEC MGIT	Pouze klasická kultivace
metoda s NALC	90 (45 %)	41 (21 %)	11 (5 %)	58 (29 %)

Graf 4: Počet a procentuální vyjádření hodnocených nálezů u metody s NALC



## 4.2 Porovnání výtěžnosti a doby detekce použitých kultivačních metod

Porovnávána byla výtěžnost a doba detekce z konvenčních kultivačních médií (klasická kultivace: LJ a Ogawa) a automatického detekčního systému BACTEC MGIT u celkového počtu 400 vzorků.

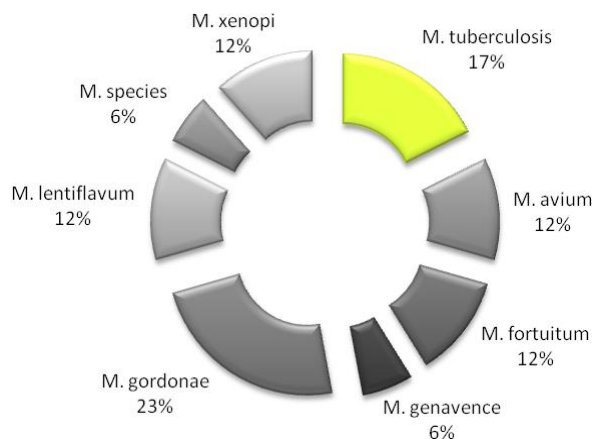
### 4.2.1 Hodnocení výtěžnosti v klasické kultivaci a BACTEC<sup>TM</sup> MGIT<sup>TM</sup> 960

Z celkového počtu 400 vzorků bylo jako 1. záchyt u pacienta izolováno 17 mykobakteriálních druhů (viz tab. 10). Z toho 3 TB kmeny a 14 NTM kmenů, přičemž největší podíl tvořily kmeny *M. gordonae* (23 %, 4 kmeny) a *M. tuberculosis* (17 %, 3 kmeny). 12 % (2 kmeny) tvořily kmeny *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. lentiflavum*, *M. xenopi* a 6 % (1 kmen) *M. genavense*, *M. species* (graf 5).

Tab. 10: Přehled izolovaných kmenů (1. záchyt)

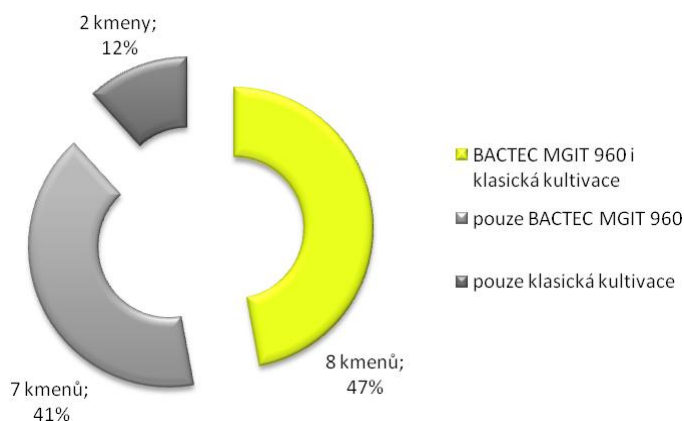
Izolovaný kmen		Počet izolovaných kmenů			Celkem
		BACTEC MGIT i klasická kultivace	Pouze BACTEC MGIT	Pouze klasická Kultivace	
TB	<i>M. tuberculosis</i>	3	0	0	3
NTM	<i>M. avium</i>	2	0	0	2
	<i>M. fortuitum</i>	1	1	0	2
	<i>M. genavense</i>	0	1	0	1
	<i>M. gordonae</i>	1	2	1	4
	<i>M. lentiflavum</i>	1	1	0	2
	<i>M. species</i>	0	0	1	1
	<i>M. xenopi</i>	0	2	0	2
	<b>Celkem</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>17</b>

Graf 5: Procentuální vyjádření izolovaných TB a NTM druhů (1. záchyt)

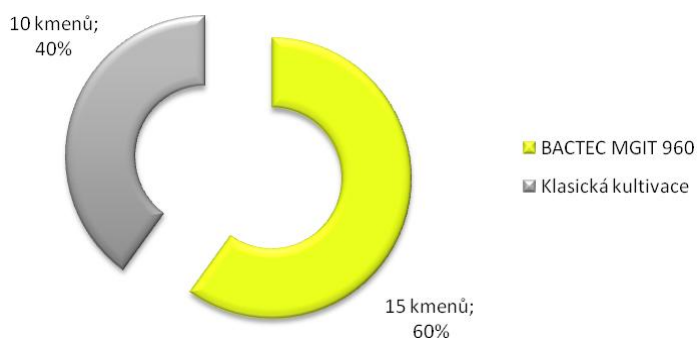


Z celkového počtu 17 izolovaných kmenů byl záchyt ve 12 % (2 NTM kmeny) klasickou metodou, v 47 % v BACTEC MGIT (7 NTM kmenů) a v 41 % (3 TB a 5 NTM kmenů) automatickým detekčním systémem i klasickou kultivací (viz tab.10, graf 6). Celkem bylo v BACTEC MGIT izolováno 15 (60 %) kmenů a klasickou kultivací 10 (40 %) kmenů (viz graf 7).

Graf 6: Srovnání výtěžnosti klasické kultivace a BACTEC MGIT



Graf 7: Procentuální srovnání záchytu mykobakteriálních kmenů klasickou kultivací a v BACTEC MGIT



#### 4.2.2 Hodnocení doby detekce v klasické kultivaci

Celkem bylo klasickou kultivací izolováno 10 kmenů, z toho 3 TB a 7 NTM. Z 3 izolovaných TB kmenů (viz tab. 11) byla pozitivita u 2 kmenů hodnocena po 21 dnech a u 1 kmene po 42 dnech inkubace. Ze 7 izolovaných NTM kmenů (viz tab. 12) byla po 21 dnech inkubace hodnocena pozitivita u 3 kmenů, ve 42. dni inkubace u 4 kmenů. Z NTM kmenů byla u 1 vzorku hodnocena kontaminace po 21 dnech inkubace a u 6 kmenů bylo hodnoceno jako negativní. Průměrná doba detekce TB a NTM kmenů byla 31,5 dní.

Tab. 11: Hodnocení doby detekce izolovaných TB kmenů klasickou kultivací

Hodnocení	Klasická kultivace (LJ, Ogawa)		
	3.týden (21 dnů)	6.týden (42 dnů)	9.týden (63 dnů)
Pozitivní	2	1	0
Negativní	0	0	0
Kontaminace	0	0	0
<b>Celkem</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

Tab. 12: Hodnocení doby detekce izolovaných NTM kmenů klasickou kultivací

Hodnocení	Klasická kultivace (LJ, Ogawa)		
	3.týden (21 dnů)	6.týden (42 dnů)	9.týden (63 dnů)
Pozitivní	3	4	0
Negativní	0	0	6
Kontaminace	1	0	0
<b>Celkem</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>6</b>

#### 4.2.3 Hodnocení doby detekce v BACTEC™ MGIT™ 960

Celkově bylo automatickým detekčním systémem izolováno 15 kmenů, z toho 3 TB a 12 NTM. Průměrná doba detekce byla 16,2 dní. Z toho u TB kmenů za 9 dní a NTM kmenů za 17,9 dní. U 11 kmenů byla signalizace růstu již do 21. dne inkubace (viz tab. 13).

Tab. 13: Hodnocení doby detekce izolovaných TB a NTM kmenů v BACTEC MGIT

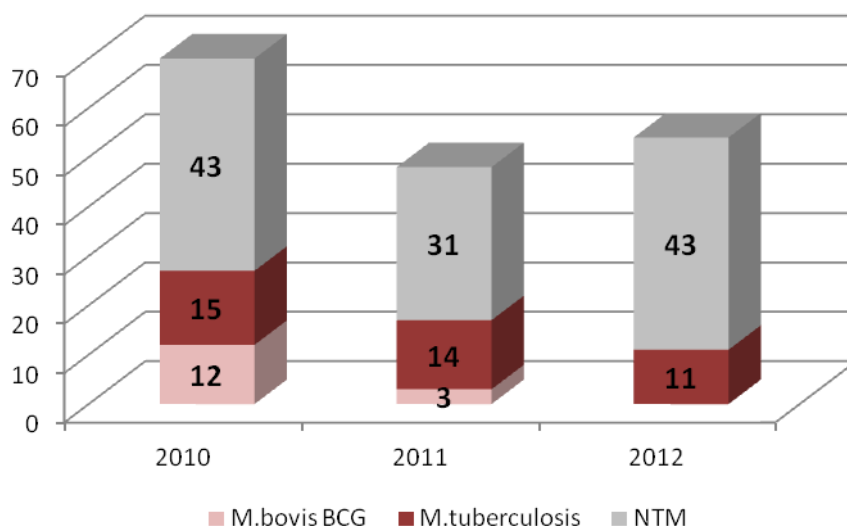
	Signalizace růstu (dní)	
	TB	NTM
≤ 5 (3 kmeny)	3	2; 4
≤ 10 (2 kmeny)	7	6; 8
≤ 15 (1 kmen)	0	0
≤ 20 (4 kmeny)	17	16; 16; 17; 20
≤ 25 (1 kmen)	0	0
> 25 (3 kmeny)	0	27; 27; 31; 41
průměrný čas detekce	9 dní	17, 9 dní
	16, 2 dní	



### **4.3 Statistický přehled izolovaných kmenů dle věku za období 2010 - 2012**

V roce 2010 bylo z celkového množství 2414 klinických vzorků izolováno 70 kmenů (27 TB a 43 NTM). Z toho 12 kmenů *M. bovis*, 15 *M. tuberculosis* a 43 NTM. V roce 2011 bylo z celkového množství 1957 klinických vzorků izolováno 38 kmenů (17 TB a 31 NTM). Z toho 3 kmeny *M. bovis BCG*, 14 *M. tuberculosis* a 31 NTM. V roce 2012 bylo z celkového množství 1772 klinických vzorků izolováno 54 kmenů. Z toho 11 kmenů *M. tuberculosis* a 43 NTM (viz graf 8).

Graf 8: Přehled izolovaných TB a NTM kmenů za období 2010 - 2012



#### **4.3.1 Statistický přehled za období 2010**

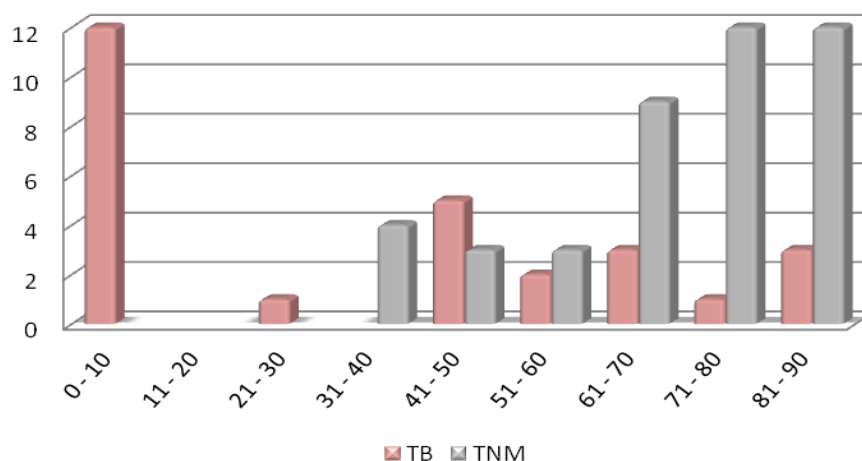
V roce 2010 bylo celkově vyšetřeno 2414 klinických vzorků (1798 sput, 128 jiných respiračních materiálů, 37 laryngeálních výtěrů, 93 močí, 4 hnis, 186 punktátů a výpotků, 2 likvory, 14 uzlin, 150 jiného materiálu). Z celkového množství 70

izolovaných kmenů (viz tab. 14) byl nejčastější záchyt u věkové kategorie 0-10 let a u 61 let a více (viz graf 9).

Tab. 14: Izolované TB a NTM kmeny v roce 2010 dle věkové kategorie

	0 - 10	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 80	81 - 90	Celkem
<i>M. tuberculosis</i>	0	0	1	0	5	2	3	1	3	<b>15</b>
<i>M.bovis BCG</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>12</b>
<i>M. avium</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	3	<b>5</b>
<i>M. fortuitum</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	<b>2</b>
<i>M. gordonae</i>	0	0	0	10	1	0	4	7	3	<b>16</b>
<i>M. intracellulare</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	<b>2</b>
<i>M. kansasii</i>	0	0	0	1	1	0	0	1	1	<b>4</b>
<i>M. lentiflavum</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	<b>2</b>
<i>M. scrofulaceum</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	<b>1</b>
<i>M. species</i>	0	0	0	0	0	0	2	2	1	<b>5</b>
<i>M. xenopi</i>	0	0	0	2	0	1	2	0	1	<b>6</b>
<b>Celkem</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>70</b>

Graf 9: Přehled izolovaných kmenů dle věkové kategorie v roce 2010



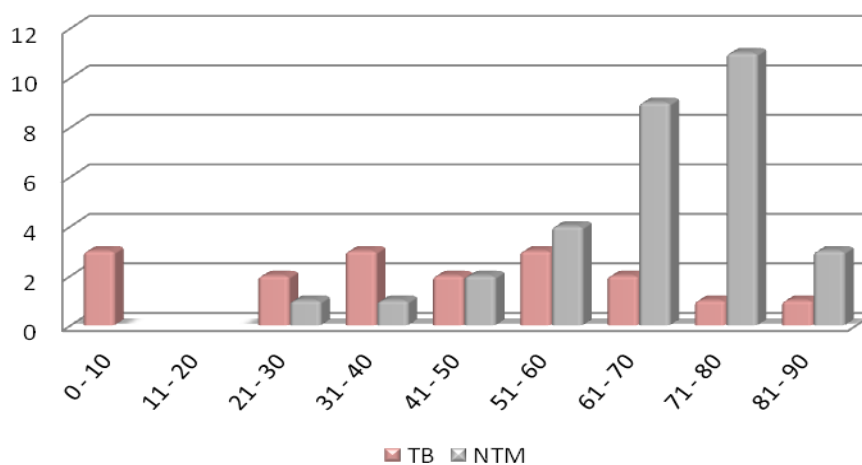
### 4.3.2 Statistický přehled za období 2011

V roce 2011 bylo celkově vyšetřeno 1957 klinických vzorků (1431 sput, 116 jiných respiračních materiálů, 71 laryngeálních výtěrů, 81 močí, 3 hnisy, 166 punktátů a výpotků, 2 likvory, 5 uzlin, 82 jiného materiálu). Z celkového množství 38 izolovaných kmenů (viz tab. 15) byl nejčastější záchyt u věkové kategorie 61 - 80 let (viz graf 10).

Tab. 15: Izolované TB a NTM kmeny v roce 2011 dle věkové kategorie

	0 - 10	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 80	81 - 90	Celkem
<i>M. tuberculosis</i>	0	0	2	3	2	3	2	1	1	14
<i>M.bovis BCG</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>M. avium</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
<i>M. gordonae</i>	0	0	0	1	1	1	3	8	2	16
<i>M. intracellulare</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
<i>M. kansasii</i>	0	0	1	0	1	1	0	1	0	4
<i>M. malmoense</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>M. scrofulaceum</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
<i>M. species</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>M. xenopi</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
<b>Celkem</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>48</b>

Graf 10: Přehled izolovaných kmenů dle věkové kategorie v roce 2011



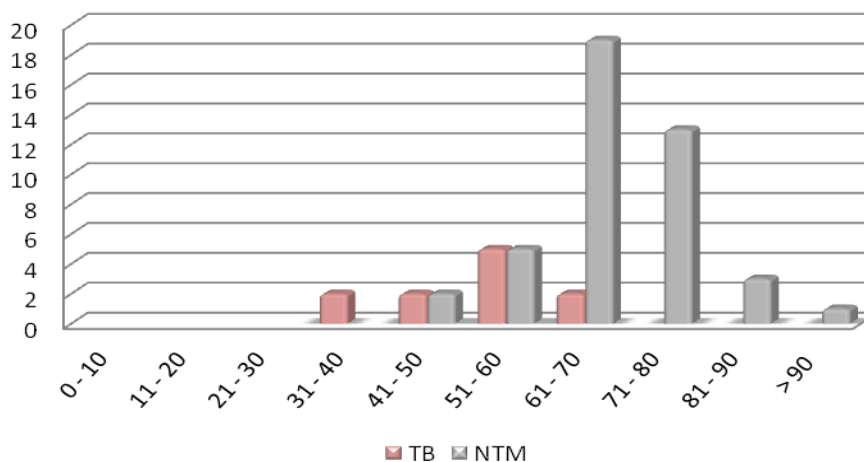
### 4.3.3 Statistický přehled za období 2012

V roce 2012 bylo celkově zpracováno 1772 klinických vzorků (1264 sput, 162 jiných respiračních materiálů, 78 laryngeálních výtěrů, 78 močí, 5 hnisů, 119 punktátů a výpotků, 1 likvor, 4 uzliny, 61 jiného materiálu). Z celkového množství 54 izolovaných kmenů (viz tab. 16) byla nejčastější záchyt u věkové kategorie 61 - 80 let (viz graf 11).

Tab. 16: Izolované TB a NTM kmeny v roce 2012 dle věkové kategorie

	0 - 10	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 80	81 - 90	> 90	Celkem
<i>M. tuberculosis</i>	0	0	0	2	2	5	2	0	0	0	<b>11</b>
<i>M. avium</i>	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	<b>6</b>
<i>M. fortuitum</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	<b>2</b>
<i>M. gordonae</i>	0	0	0	0	1	1	9	6	3	1	<b>21</b>
<i>M. intracellulare</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	<b>3</b>
<i>M. kansasii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	<b>1</b>
<i>M. lentiflavum</i>	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	<b>5</b>
<i>M. malmoense</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	<b>1</b>
<i>M. species</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	<b>3</b>
<i>M. xenopi</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<b>Celkem</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>21</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>54</b>

Graf 11: Přehled izolovaných kmenů dle věkové kategorie v roce 2012



## 5. Diskuse

V této studii bylo jedním z cílů práce porovnání a ověření účinnosti dekontaminačních metod, které jsou základním krokem při laboratorním průkazu. Během období 1.1. - 6.6. 2013 bylo celkem vyšetřeno 400 sput zaslaných jak z lůžkových, tak i z ambulantních oddělení (na průkaz mykobakterií / průkaz BK), která byla zpracována dle postupů používaných laboratoří. V této studii bylo jedno omezení. Vzhledem k nedostupnosti vzorků nemohlo být paralelně provedeno ověření účinnosti dekontaminačních metod. Dekontaminační metoda s HCl byla tedy použita na jednu polovinu (200) a metoda s NALC na druhou polovinu vzorků (200).

U metody s HCl bylo celkem 92 % (185) kultivací vyhodnoceno jako negativní. Kontaminace byla zaznamenána v BACTEC MGIT u 5 % (9), v klasické kultivaci u 4 % (8) a u obou metod u 1 % (2) vzorků (viz tab. 8). Na druhé straně u metody s NALC bylo jako negativní vyhodnoceno 45 % (90) vzorků a kontaminace v BACTEC MGIT byla zaznamenána u 26 % (52) vzorků, v klasické kultivaci u 50 % (99) vzorků. Kontaminace v obou použitých kultivačních metodách byla zaznamenána celkem u 21 % (41) vzorků (viz tab. 9). Porovnáním těchto výsledků je tedy patrná nižší účinnost dekontaminace při použití metody s NALC, kdy bylo celkem kontaminováno 21 % vzorků (41), oproti 1 % u metody s HCl. Obecně je jako nadměrné znečištění definována kontaminace vzorků vyšší než 5 %, při vyšší kontaminaci je použitá metoda pravděpodobně příliš slabá [Murray 2007]. Shrnutím výsledků lze konstatovat, že metoda s NALC je zcela nevyhovující, pokud nebude přistoupeno k opatřením, která by míru kontaminace snížila. Důvodem by mohla být krátká doba dekontaminace (15 min). K podobným výsledkům u metody s NALC dospěla ve své studii i Kozáková [2006], která přistoupila k prodloužení doby dekontaminace. Zároveň je i možné, že chybou, která tuto metodu může zatížit je vlastní příprava dekontaminačního roztoku (NaOH + Na<sub>3</sub> citrát + NALC). Zajímavé je ale i porovnání, při kterém typu kultivační metody byla kontaminace u příslušné dekontaminační metody zaznamenána. U metody s HCl se celkové výsledky v podstatě nelišily (5 % BACTEC MGIT, 4 % klasická kultivace), zdá se tedy, že dekontaminace je dostatečně spolehlivá. U metody s NALC je patrný rozdíl

mezi klasickou kultivací (50 %) a BACTEC MGIT (26 %). Jedním z faktorů vysoké míry znečištění by mohla být již zmíněná doba dekontaminace. Zároveň by tento rozdíl mohl být vysvětlen i přidavkem suplementu PANTA s obsahem antimikrobiálních látek (polymyxin B, amfotericin B, kyselina nalidixová, trimetoprim, azlocilin), který se přidává do zkumavek BBL MGIT s tekutým médiem Middlebrook 7H9 [Becton, Dickinson and Company 2011], neboť pro přípravu půd používaných v klasické kultivaci (LJ, Ogawa) není dle doporučených standardních metod přidání AML doporučeno [1998]. Účinnost dekontaminační metody s HCl lze kladně hodnotit, není ale výrobcem ověřena pro BACTEC MGIT. Další variantou by mohlo být ověření účinnosti jiné dekontaminační metody - Petroffova metoda. Tato metoda je také často používána v laboratořích využívajících ke kultivaci BACTEC MGIT [SZÚ Praha]. Hlavní složkou je rovněž 4 % NaOH. Metoda sice vyžaduje časově delší přípravu, ale z ekonomického hlediska je její cena příznivá.

Dalším cílem bylo porovnání výtěžnosti a hodnocení doby detekce u klasické kultivace (LJ, Ogawa) a automatického detekčního systému BACTEC MGIT z hlediska záchytu izolovaných kmenů ve stejném časovém období a ze stejného počtu vzorků (400), jako u ověření dekontaminačních metod. Výsledky ukazují, že bylo celkem nově izolováno 17 mykobakteriálních kmenů TB i NTM (viz tab. 10). Z toho se jednalo o 3 kmeny TB (17 %) a o 14 kmenů NTM (83 %, viz graf 5). Záchyt u obou použitých metod byl v 7 případech (41 %). Pouze klasickou kultivací byly prokázány 2 kmeny (12 %), pouze automatickou kultivací v BACTEC MGIT bylo prokázáno 8 kmenů (47 %, viz graf 6). Při porovnání obou metod je zřejmé, že systém BACTEC MGIT je oproti klasické kultivaci citlivější, neboť záchyt činil 60 % ve srovnání se 40 % klasické kultivace (viz graf 7), ale 100% citlivost prokázána nebyla. Systém nezachytil 2 kmeny. I Lu et al. 2002 ve své studii potvrzuje, že systém BACTEC MGIT vykazuje oproti klasické kultivaci lepší výtěžnost, i když citlivost není vždy 100 %. Jedním z možných důvodů je pravděpodobně nedostatečná kvantita (systém zachytí koncentraci přibližně v počtu  $10^5$  až  $10^6$  CFU/ml) [Becton, Dickinson and Company 2011]. Klasická kultivace by měla být citlivější, neboť lze zachytit i zcela ojedinělý nález, pokud je makroskopicky viditelný. Na druhé straně bylo takto zachyceno pouze 10 kmenů

z celkových 17. Dle mého názoru je vhodné paralelně používat metody rozdílného typu kultivace, čímž dochází ke zvýšení citlivosti záchytu. Podstatným důvodem je ale i skutečnost, že na každé půdě jsou pozorovatelné rozdílné morfologické znaky růstu. Vezmeme-li dále v úvahu i dobu detekce, je jasně patrné, že v případě BACTEC MGIT je výrazně kratší. Průměrná doba detekce byla 16,2 dní, zatímco u klasické kultivace 31,5 dní. Tento rozdíl lze jednoduše vysvětlit, neboť důležitým faktorem je hodnocení u jednotlivých metod. V automatickém systému je detekována fluorescence, která je přímo úměrná množství mikroorganismy spotřebovaného kyslíku a při dosažení určité koncentrace je následně monitorována (60 minutový interval). Oproti tomu u klasické metody je nutné vyčkat na makroskopicky viditelné kolonie (3., 6. nebo 9. týden) (viz teorie). Velmi důležitou skutečností u hodnocení je, jak i Záruba et al. 2002 uvádí, že do 21. dne kultivace byl systémem BACTEC MGIT zachycen oproti klasické kultivaci vyšší počet izolátů. Toto lze pouze jenom potvrdit, neboť jak má studie ukazuje, systémem bylo do 21. dne zachyceno již 11 z celkově 15 zachycených kmenů (viz tab. 13). Vyšší výtěžnost a zkrácení doby detekce je velkým přínosem z pohledu diagnostiky, neboť lze tak následně urychlit stanovení druhové identifikace a následně pak stanovení lékové citlivosti základní řady ATT, kterou též automatickým systémem lze provést. Z pohledu dnešní doby je toto velkým přínosem, neboť problémem je stoupající rezistence k ATT. Stále častěji se vyskytují MDR a XDR kmeny *Mycobacterium tuberculosis*.

V závěru své studie jsem zpracovala statistické údaje izolovaných kmenů na pracovišti PBAK za období 2010 - 2012. Ze zpracovaných dat je patrný mírný pokles záchytu mykobakterií, převážně TB kmenů (viz graf 8), ale zároveň i snížení počtu vyšetřovaných vzorků. V roce 2010 bylo na pracovišti PBAK celkově zpracováno 2414 klinických vzorků a z nich izolováno 27 TB (komplex *M. tuberculosis*) a 43 NTM kmenů, celkem tedy 70 mykobakteriálních kmenů. TB kmeny byly zastoupeny 15 kmeny *M. tuberculosis* a 12 izolovanými kmeny *M. bovis* BCG (viz tab. 14). Častý byl záchyt u věkové kategorie 0-10 a 61-90 let (viz graf 9). Z celkového množství 1957 zpracovaných klinických vzorků v roce 2011 bylo izolováno 17 TB a 31 NTM, celkem 48 kmenů. Skupinu TB kmenů tvořilo 14 kmenů *M. tuberculosis* a 3 kmeny *M. bovis*

*BCG* (viz tab. 15). Častý byl záchyt u věkové kategorie 61-90 let (viz graf 10). V roce 2012 bylo z celkového množství (1772) zpracovaných vzorků izolováno 11 TB (*M. tuberculosis*) a 43 NTM kmenů, celkem 54 kmenů (viz tab. 16). Častý byl záchyt u věkové kategorie 61-80 let (viz graf 11). Je otázkou, zda je to snížením počtu infikovaných jedinců nebo indikací k vyšetření. Vezmeme-li v úvahu záchyt TB a NTM kmenů, nedochází i při poklesu počtu vyšetřovaných vzorků k výraznému snížení, což ukazuje na cílenou indikaci vyšetření. Znatelný je pokles u kmenů *M. bovis BCG*. Toto se dá vysvětlit tím, že očkování proti TBC není již od roku 2011 prováděno plošně, ale podle nové platné legislativy pouze u rizikových skupin (viz graf 10, 11, 12). Zajímavou skutečností je i to, že každoročně je v laboratoři nejvyšší záchyt ve věkové kategorii nad 60 let. I když, jak *ÚZIS ČR* (2013) ve své zprávě uvádí, že hlediska věkových skupin je za poslední rok nejvíce nemocných (absolutně i relativně) ve věkové kategorii nad 75 let.



## 6. Závěr

V práci byla porovnána a ověřena účinnost jednotlivých dekontaminačních metod, které jsou základním krokem při detekci mykobakterií. Ověření bylo důležité i z hlediska provozu laboratoře, neboť v letošním roce 2013 byl od začátku roku na PBAK zaveden do provozu nový typ automatického detekčního systému - BACTEC™ MGIT™ 960, pro který je výrobcem metodicky doporučeno použití metody s NALC. Porovnáním metod, u kterých byla účinnost ověřována, byla metoda s HCl v porovnání s metodou NALC vyhodnocena jako účinnější. Kontaminace, která byla rozhodujícím kritériem pro hodnocení byla 1 % vzorků u metody HCl a 21 % vzorků u NALC. Výsledky u metody s HCl byly uspokojivé, ale její účinnost pro BACTEC™ MGIT™ 960 není výrobcem ověřena.

Při porovnání jednotlivých kultivačních metod bylo u systému BACTEC™ MGIT™ 960 prokázáno, že vykazuje oproti klasické kultivaci vyšší citlivost a zároveň i výrazně kratší rychlost detekce. Tato kratší doba detekce je zároveň přínosem k urychlení následné druhové identifikace a vyšetření citlivosti na ATT, která je v současné době v laboratoři testována. Optimálních výsledků je ale dosaženo kombinací obou používaných metod, neboť jak studie ukázala, citlivost u BACTEC™ MGIT™ 960 nebyla vždy 100%.

Ze statistického přehledu izolovaných kmenů za období 2010 - 2012 je patrné, že laboratoř sice zpracovává méně vzorků, ale záchyt izolovaných kmenů zůstává na stejné úrovni. Patrný je pouze výrazný pokles izolovaných kmenů *M. bovis BCG* a každoročně je nejčastější záchyt ve věkové kategorii nad 60 let.

## 7. Seznam použité literatury

Alli, OA., Ogbolu, OD., Alaka, OO. Direct *molecular detection of Mycobacterium tuberculosis complex from clinical samples – An adjunct to cultural method of laboratory diagnosis of tuberculosis*. N Am J Med Sci. 2011; 3(6): 281-288.

Bártů, V. *Tuberkulóza ve světle 21. století*. Medical Tribune 2010; 4: D2.

Becton, Dickinson and Company. *BACTEC<sup>TM</sup> MGIT<sup>TM</sup> 960 Uživatelská příručka systému*. 2004/06, Číslo dokumentu: MA-0117, Revize: E, Katalogové číslo: 445876.

Becton, Dickinson and Company. *BBL MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 ml s BACTEC MGIT 960 Supplement Kit (doplňková sada) - příbalový leták*. 2011/06; L000180JAA.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha: Marvil, 1996, s. 305 - 311. ISBN 80-238-0297-6.

bioMérieux, Inc., *BacT/ALERT<sup>®</sup> MP - příbalový leták*. REF 259797 259760 259787, 43-03064 - RA-3 - CS - 2008/01.

Espy, MJ., Uhl, JR., Sloan, LM., Buckwalter, SP., Jones, MF., Vetter, EA., Yao, JDC., Wengenack, NL., Rosenblatt, JE., Cockerill III, FR., Smith, TF. *Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing*. Clin Microbiol Rev. 2006; 19: 165-256.

Chioji, A., Kazue, H., Testuo, T. *Simple and Rapid Identification of the Mycobacterium tuberculosis Complex by Immunochromatographic Assay Using Anti-MPB64 Monoclonal Antibodies*. J Clin Microbiol. 1999 November; 37(11): 3693–3697.

García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., Solari, S. *Bacterial identification based on protein mass spectrometry: A new insight at the microbiology of the 21<sup>st</sup> century*. Rev Chilena Infectol 2012; 29 (3): 263-272.

Garrigó, M., Aragón, LM., Alcaide, F., Borrell, S., Cardeñosa, E., Galán, JJ., Gonzales-Martín, J., Martín-Casabona, N., Moreno, C., Salvado, M., Coll, P. *Multicenter laboratory evaluation of the MB/BacT Mycobacterium detection system and the BACTEC MGIT 960 system in comparison with the BACTEC 460TB system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2007 Jun; 45(6): 1766-70.

Greenwood, D., Slack, CBR., Peutherer, JF et al. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vydání české. Praha: Grada Publishing, 1999, 215 - 234. ISBN 80-7169-365-0.

Havelková, M., Mezenský, L. *Testování citlivosti Mycobacterium tuberculosis na základní antituberkulotika. Doplněk k doporučeným standardním metodám v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí*. Klin mikrobiol inf lék 2003; 9(6): 304-306.

Homolka, J., Votava, V. *Tuberkulóza*. 4. upravené vydání. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2070-1.

ISBT. [www.trios.cz](http://www.trios.cz) [online]. [cit. 2013-08-13]. Dostupné z: [http://www.trios.cz/sgg/me\\_1.htm](http://www.trios.cz/sgg/me_1.htm)

Klaban, V. *Svět mikrobů: Malý mikrobiologický slovník*. 1. vydání. Hradec Králové: Gaudeamus, 1999. ISBN 80-7041-639-4.

Kočárek, E. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vydání. Brno: NCO NZO, 2007, s. 95-96. ISBN 978-80-7013-450-4.

Kolek, V., Kašák, V., Vašáková, M. a kolektiv. *Pneumologie*. 1. vydání. Praha: Maxdorf, 2011, s. 495 - 501. ISBN 978-80-7345-255-1.

Kolektiv autorů. *Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí*. Praha: Národní referenční jednotka pro mykobakterie, SZÚ Praha ve spolupráci s firmou Trios, s.r.o., 1998.

Kozáková, B. *Posouzení účinnosti metabolické kultivační rychlometody MGIT (manuální systém) pro záchyt mykobakterií ve srovnání s klasickou kultivační metodou*. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 2006; 1(55): 37-40.

Kubín, M. a kolektiv. *Výšetřovací metody u mykobakteriálních infekcí*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1986. 86 2038. ISBN 08-029-86.

Lu, D., Heeren, B., Dunne, WM. *Comparison of the Automated Mycobacteria Growth Indicator Tube System (BACTEC 960/MGIT) With Löwenstein-Jensen Medium For Recovery of Mycobacteria From Clinical Specimens*. Am J Clin Pathol. 2002 Oct; 118(4): 542-5.

Murray, PR. *Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY: 9TH edition*. Washington: ASM, 2007, s. 543 - 566. ISBN 978-1-55581-371-0.

Nagai, S., Wiker, HG., Harboe, M., Kinomoto, M. *Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis*. Infet Immun. 1991; 59: 372-382.

Národní jednotka dohledu nad TBC: *bulovka.cz* [online]. [cit. 2013-08-13]. Dostupné z: <http://bulovka.cz/kliniky-a-oddeleni/oddeleni/narodni-jednotka-dohledu-nad-tbc>

Parrish, NM., Carroll, KC. *Role of the Clinical Mycobacteriology Laboratory in Diagnosis and Management of Tuberculosis in Low-Prevalence Settings*. J Clin Microbiol. 2011; 49: 772-776.

Piersimoni, C., Scarparo, C., Callegaro, A., Tosi, CP., Nista, D., Bornigia, S., Scagnelli, M., Rigon, A., Ruggiero, G., Goglio, A. *Comparison of MB/Bact alert 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study*. J Clin Microbiol. 2001 Feb; 39(2): 651-7.

Powell III, RD., Whitworth, WC., Bernardo, J., Moonan, PK., Mazurek, GH. *Unusual Interferon Gamma Measurements with QuantiFERON-TB Gold and QuantiFERON-TB Gold In-Tube Tests*. PLoS One. 2011; 6: e20061.

Richter, E., Rüsç-Gerdes, S., Hilleman D. *Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures*. J Clin Microbiol. 2006 May; 44(5): 1769-1775.

Schindler, J. *Mikrobiologie*. 1. vydání. Praha: Grada publishing, a.s., 2010, s. 107 - 111. ISBN 978-80-247-3170-4.

Stoffels, K., Allix-Béguet, C., Groenen, G., Wanlin, M., Berkvens, D., Mathys, V., Supply, P., Fauville-Dufaux, M. *From Multidrug- to Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: Upward Trends as Seen from a 15-Year Nationwide Study*. PLoS One. 2013; 8(5): e63128.

SZÚ PRAHA. *Závěrečná zpráva: Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii (Externí hodnocení kvality) - PT#M/2/2013(č.776); MYKOBAKTERIE - průkaz metabolickými metodami*. Praha, 2013.

Suffys, PN., da Silva Rocha, A., de Oliveira, M., Dias Campos, CE., Barreto, WAM., Portaels, F., Rigouts, L., Wouters, G. Jannes, G., van Reybroeck, G., Mijs, W., Vanderborght, B. *Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level Using INNO-LiPA Mycobacteria, a Reverse Hybridization Assay*. J Clin Microbiol. 2001 December; 39(12): 4477–4482.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, s. 59 - 110. ISBN 80-210-3841-1.

Šula, L. *Mikrobiologie tuberkulózy*. 1. vydání. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1965. ISBN 08-055-65.

ÚZIS ČR. [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz) [online]. [cit. 2013-08-12]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/registry/organu-ochrany-verejneho-zdravi/registr-tuberkulozy>

Van Belkum, A., Welker, M., Erhard, M., Chatellier, S. *Biomedical mass spectrometry in today's and tomorrow's clinical microbiology laboratories*. J Clin Microbiol. 2012 May; 50(5): 1513-7.

Votava, M. a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, s. 159 - 168. ISBN 80-902896-6-5.

Votava, M. a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*, Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.

Yu, MC., Chen, HY., Wu, MH., Huan, WL., Kuo, YM., Yu, FL., Jou, R. *Evaluation of the rapid MGIT TBC identification test for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex strain detection*. J Clin Microbiol. 2011 Mar; 49(3): 8027. doi: 10.1128/JCM.02243-10. Epub 2010 Dec 29.

Záruba, R., Králová, M. *Posouzení účinnosti automatického kultivačního systému pro záchyt mykobakterií BACTEC MGIT 960 ve srovnání s klasickou kultivační metodou. Zkušenosti po jednoročním provozu.* Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 2002; 2(51): 66-70.

## **8. Klíčová slova**

BACTEC™ MGIT™ 960

dekontaminační metoda

HCl

klasická kultivace

mycobacterium

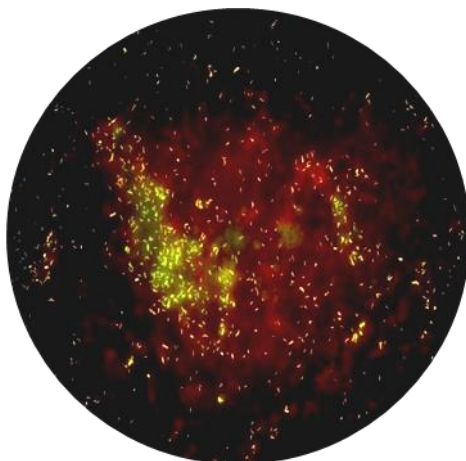
NALC

NTM



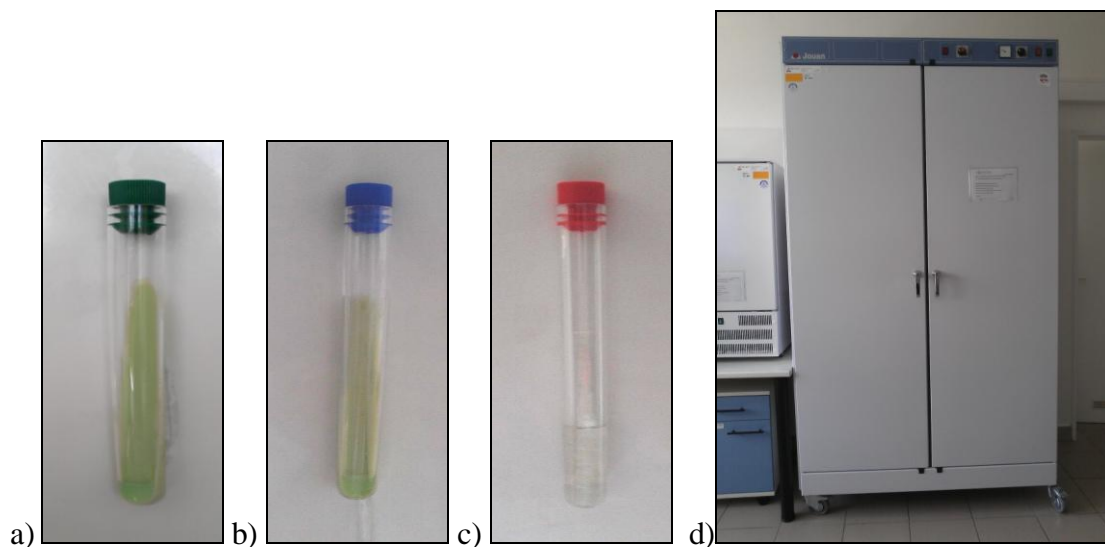
## 9. Přílohy

Příloha 1: ART, fluorescenční barvení (nativní nátěr)



Zdroj: vlastní

Příloha 2: (a) Löwenstein-Jensenova půda, (b) půda podle Ogawy, (c) Šulova půda, (d) termostat



Zdroj: vlastní

Příloha 3: (a) Automatický detekční systém BacT / ALERT<sup>®</sup> 3D, (b) kultivační lahvička BacT/ALERT<sup>®</sup> MP



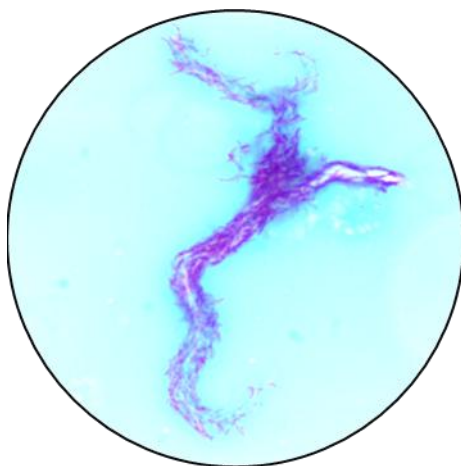
Zdroj: vlastní

Příloha 4: (a) Automatický detekční systém BACTEC<sup>™</sup> MGIT<sup>™</sup> 960, (b) kultivační zkumavka BBL<sup>™</sup> MGIT<sup>™</sup> 7 ml



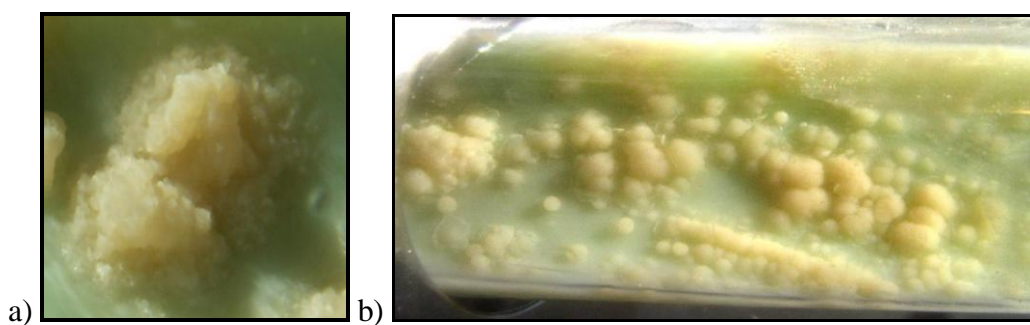
Zdroj: vlastní

Příloha 5: ART, barvení dle Ziehl-Neelsena (kultura: *Mycobacterium tuberculosis*)



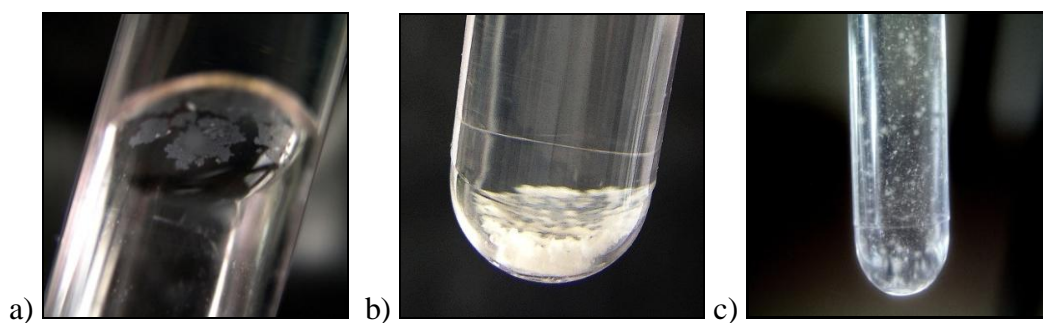
Zdroj: vlastní

Příloha 6: pevná vaječná půda LJ (*Mycobacterium tuberculosis*)



Zdroj: vlastní

Příloha 7: tekutá Šulova půda (*Mycobacterium tuberculosis*)



Zdroj: vlastní