



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů (KLI)

Bakalářská práce

Stanovení citlivosti na antituberkulóza u kmenů *Mycobacterium tuberculosis*

Vypracovala: Denisa Suchá, DiS.
Vedoucí práce: MUDr. Jana Amlerová

České Budějovice 2014

ABSTRAKT

Mycobacterium tuberculosis bylo objeveno německým lékařem a mikrobiologem Robertem Kochem již v roce 1882. Jsou to obligátně patogenní bakterie způsobující u člověka velmi vážné infekční onemocnění – tuberkulózu. Toto onemocnění představuje celosvětově velký epidemiologický problém. Ke snížení výskytu a zabránění šíření této nemoci je nutné diagnostikovat všechny případy onemocnění, pacienty izolovat a podrobit správné léčbě. Zásadní součástí diagnostiky tuberkulózy je kultivační ověření nemoci tj. izolace *Mycobacterium tuberculosis* ze vzorku klinického materiálu, přesná identifikace a stanovení citlivosti k antituberkulotikům.

Tématem této bakalářské práce bylo stanovení citlivosti k základním antituberkulotikům (streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol a pyrazinamid). Teoretická část obsahuje přehled metod stanovení citlivosti. V praktické části byl vyšetřen soubor 275 izolátů *Mycobacterium tuberculosis* z patientských vzorků klinického materiálu izolovaných na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň v Laboratoři pro diagnostiku mykobakterií v časovém období leden 2008 až červen 2013. U všech izolátů bylo provedeno stanovení citlivosti k antituberkulotikům dvěma metodami - proporční metodou dle Canettiho a metodou v poloautomatickém uzavřeném systému BACTEC[®] MGIT[™] 960. Výsledky prokázaly 100% shodu v obou metodách. U 24 testovaných izolátů byla prokázána rezistence minimálně na jedno ze základních antituberkulotik.

Vyšetřovaný soubor byl také hodnocen z hlediska demografického a epidemiologického. Zastoupení pacientů podle pohlaví prokázalo vyšší výskyt tuberkulózy u mužů (75 % mužů a 25 % žen). Z hlediska věkového byl prokázán nejvyšší výskyt ve středním věku tj. mezi 40. a 60. rokem věku. Podíl cizinců byl v tomto souboru 30 %. Ačkoliv Česká republika patří k zemím s nízkým výskytem tuberkulózy, nelze tuto situaci podceňovat už jen vzhledem k tomu, že dochází k neustálé migraci osob do České republiky ze států, kde je výskyt tuberkulózy a jejich rezistentních kmenů vysoký.

Klíčová slova: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberkulóza, rezistence, antituberkulotika, stanovení citlivosti

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis was first described by a German physician and microbiologist Robert Koch in the year 1882. It is an obligate pathogen, which causes a very serious infectious disease - tuberculosis. This disease is an important epidemiological problem all over the world. It is necessary to diagnose all the clinical cases of the disease, isolate the patients and apply an adequate treatment to reduce the incidence of the disease and to prevent its spread. Essential for the diagnosis of tuberculosis is a confirmation by cultivation, i.e. isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens, exact identification of the isolates and antitubercular drug susceptibility testing.

The theme of this thesis was to determine the susceptibility to the basic anti-tubercular agents (streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol and pyrazinamide). The theoretical part provides an overview of susceptibility testing methods. A group of 275 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from January 2008 to June 2013 from clinical specimens, in the Department of Microbiology of the Faculty Hospital in Pilsen, the Laboratory for Diagnosis of Mycobacteria was examined within the practical part. The susceptibility to antitubercular drugs was tested in all the isolates by two methods – the proportion method (Canetti, 1963) and the method in semi-closed system BACTEC[®] MGIT[™] 960. The results showed 100% concordance between both methods. The resistance was proved to at least one of the basic antitubercular drugs in 24 of tested isolates.

The file was also evaluated from the demographical and epidemiological point of view. There was a higher incidence of tuberculosis among men (75% men and 25% women). In terms of age, the highest incidence has been shown between 40 and 60 years of age. The percentage of foreigners in the investigated group was 30 %. The Czech Republic is a country with a low incidence of tuberculosis, however, this situation can not be underestimated, if only due to the fact that there is a constant migration of people into the Czech Republic from the countries with a high incidence of tuberculosis and its drug-resistant strains.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, resistance, antituberkulotika
determine the sensitivity

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 své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2014

.....

Denisa Suchá, DiS.

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce MUDr. Janě Amlerové za její cenné rady, odborné vedení bakalářské práce, trpělivý a laskavý přístup.

Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Evě Chudáčkové z ÚM FN Plzeň, celému kolektivu Laboratoře pro diagnostiku mykobakterií v Plzni a FN Plzeň za poskytnutí podkladů a umožnění laboratorní práce.

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	MYKOBACTERIE	12
2.1.1	<i>Vlastnosti mykobakterií</i>	12
2.1.2	<i>Chemické složení mykobakterií</i>	12
2.2	MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.....	14
2.2.1	<i>Historie Mycobacterium tuberculosis</i>	14
2.2.1.1	Robert Koch.....	14
2.2.1.1.1	Kochovy postuláty	15
2.2.2	<i>Historie tuberkulózy</i>	15
2.2.3	<i>Význam Mycobacterium tuberculosis</i>	15
2.2.4	<i>Epidemiologie Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.2.4.1	Informační systém bacilární tuberkulózy	17
2.2.4.2	Registr tuberkulózy	17
2.2.4.3	Výskyt tuberkulózy ve světě.....	18
2.2.5	<i>Morfologie Mycobacterium tuberculosis</i>	19
2.2.6	<i>Odolnost vůči zevním vlivům</i>	19
2.2.7	<i>Zdroj a přenos infekce</i>	20
2.2.7.1	Inhalace	20
2.2.7.2	Přímý kontakt.....	20
2.2.7.3	Ingesce	21
2.2.7.4	Přenos hematogenní	21
2.2.8	<i>Prevence infekce Mycobacterium tuberculosis</i>	21
2.2.9	<i>Patogeneze Mycobacterium tuberculosis</i>	22
2.2.9.1	Primární tuberkulóza	23
2.2.9.2	Postprimární tuberkulóza.....	24
2.2.10	<i>Patogenita Mycobacterium tuberculosis</i>	24
2.2.11	<i>Klinické vzorky</i>	25
2.2.12	<i>Bezpečnost práce</i>	25
2.2.13	<i>Laboratorní průkaz</i>	26
2.2.13.1	Mikroskopie	26
2.2.13.1.1	Barvení dle Ziehl-Neelsena	27
2.2.13.1.2	Fluorescenční barvení	27
2.2.13.2	Kultivace <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
2.2.13.2.1	Kultivace v tekutých půdách	28
2.2.13.2.2	Kultivace na pevných půdách.....	29
2.2.13.3	Identifikace <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
2.2.13.4	Moderní metody	29
2.2.13.5	Testování citlivosti <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
2.2.13.5.1	Metody testování citlivosti <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
2.2.13.5.1.1	Stanovení citlivosti poroční metodou	33
2.2.13.5.1.1.1	Výhody a nevýhody poroční metody.....	34
2.2.13.5.1.2	Testování citlivosti v BACTEC® MGIT™ 960.....	34
2.2.13.5.1.2.1	Výhody a nevýhody testování citlivosti v BACTEC® MGIT™ 960.....	34

2.2.13.6	Nepřímá diagnostika.....	34
2.2.14	<i>Terapie onemocnění způsobených Mycobacterium tuberculosis</i>	35
2.2.14.1	Léčebné fáze	36
2.2.14.1.1	Iniciální fáze	36
2.2.14.1.2	Pokračující fáze	36
2.2.14.2	Antituberkulotika	37
2.2.14.2.1	Historie antituberkulotik	37
2.2.14.2.2	Základní antituberkulotika	38
2.2.14.2.2.1	Streptomycin (STM)	38
2.2.14.2.2.1.1	Vlastnosti STM.....	38
2.2.14.2.2.1.2	Spektrum účinku STM.....	39
2.2.14.2.2.1.3	Mechanismus účinku STM.....	39
2.2.14.2.2.1.4	Cesta podání STM.....	39
2.2.14.2.2.1.5	Farmakokinetika STM.....	39
2.2.14.2.2.1.6	Vedlejší nežádoucí účinky STM.....	40
2.2.14.2.2.1.7	Kontraindikace podání STM	40
2.2.14.2.2.2	Isoniazid (INH).....	41
2.2.14.2.2.2.1	Vlastnosti INH	41
2.2.14.2.2.2.2	Spektrum účinku INH	41
2.2.14.2.2.2.3	Mechanismus účinku INH.....	41
2.2.14.2.2.2.4	Cesta podání INH.....	41
2.2.14.2.2.2.5	Farmakokinetika INH.....	42
2.2.14.2.2.2.6	Vedlejší nežádoucí účinky INH	42
2.2.14.2.2.2.7	Kontraindikace podání INH.....	42
2.2.14.2.2.3	Rifampicin (RMP)	43
2.2.14.2.2.3.1	Vlastnosti RMP.....	43
2.2.14.2.2.3.2	Spektrum účinku RMP	43
2.2.14.2.2.3.3	Mechanismus účinku RMP.....	43
2.2.14.2.2.3.4	Cesta podání RMP	43
2.2.14.2.2.3.5	Farmakokinetika RMP	44
2.2.14.2.2.3.6	Vedlejší nežádoucí účinky RMP.....	44
2.2.14.2.2.3.7	Kontraindikace podání RMP	44
2.2.14.2.2.4	Ethambutol (EMB).....	45
2.2.14.2.2.4.1	Vlastnosti EMB.....	45
2.2.14.2.2.4.2	Spektrum účinku EMB.....	45
2.2.14.2.2.4.3	Mechanismus účinku EMB	45
2.2.14.2.2.4.4	Cesta podání EMB	45
2.2.14.2.2.4.5	Farmakokinetika EMB	46
2.2.14.2.2.4.6	Vedlejší nežádoucí účinky EMB	46
2.2.14.2.2.4.7	Kontraindikace podání EMB	46
2.2.14.2.2.5	Pyrazinamid (PZA)	47
2.2.14.2.2.5.1	Vlastnosti PZA.....	47
2.2.14.2.2.5.2	Spektrum účinku PZA.....	47
2.2.14.2.2.5.3	Mechanismus účinku PZA	47
2.2.14.2.2.5.4	Cesta podání PZA	47
2.2.14.2.2.5.5	Farmakokinetika PZA	47
2.2.14.2.2.5.6	Vedlejší nežádoucí účinky PZA	48

2.2.14.2.2.5.7 Kontraindikace podání PZA	48
2.2.14.2.3 Rezistence na antituberkulotika	48
2.2.14.2.3.1 Primární rezistence	49
2.2.14.2.3.2 Sekundární rezistence	49
2.2.14.2.4 Rezistence Mycobacterium tuberculosis	49
2.2.14.2.4.1 Multidrug-resistant (MDR)	50
3 CÍL PRÁCE.....	51
4 METODIKA	52
4.1 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÉHO SOUBORU	52
4.2 POUŽITÉ METODY TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	53
4.2.1 <i>Pomůcky- proporční metoda podle Canettiho.....</i>	<i>53</i>
4.2.1.1 Přístrojové vybavení	53
4.2.1.2 Technické pomůcky	53
4.2.1.3 Chemické pomůcky	54
4.2.1.3.1 Použité kultivační půdy Löwenstein-Jensen (LJ) s obsahem léčiv (mg/l)	54
4.2.2 <i>Pomůcky - testování citlivosti v uzavřeném systému BACTEC® MGIT™ 960.....</i>	<i>54</i>
4.2.2.1 Přístrojové vybavení	54
4.2.2.2 Technické pomůcky	55
4.2.2.3 Chemické pomůcky	55
4.2.2.4 Komerční vybavení k metodě (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 55	
4.2.2.4.1 Příprava ředění antituberkulotik	56
4.2.3 <i>Shodná část metodického postupu pro obě použité metody</i>	<i>56</i>
4.2.3.1 Příprava pomůcek	56
4.2.3.2 Zpracování izolátů	57
4.2.3.2.1 Zpracování izolátu ze zkumavky BACTEC® MGIT™ 960	57
4.2.3.2.2 Zpracování izolátu z pevné vaječné půdy	57
4.2.3.3 Část postupu ředění společný pro obě metody	58
4.2.3.4 Postup ředění, inokulace, inkubace a vyhodnocení proporční metody dle Canettiho ..	58
4.2.3.5 Postup ředění, inokulace, inkubace a vyhodnocení testování citlivosti v uzavřeném systému BACTEC® MGIT™ 960	60
5 VÝSLEDKY.....	62
5.1 DEMOGRAFICKÉ ÚDAJE	62
5.2 PŮVOD VZORKŮ KLINICKÉHO MATERIÁLU	65
5.3 DRUH MATERIÁLU	65
5.4 VÝSLEDKY STANOVENÍ CITLIVOSTI	66
6 DISKUSE	68
7 ZÁVĚR	72
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73
9 PŘÍLOHY	79

1 ÚVOD

Mycobacterium tuberculosis je obligátně aerobní bakterie, která způsobuje jedno z historicky nejstarších infekčních onemocnění, a to tuberkulózu. Ačkoli se v roce 2011 v České republice odstoupilo od očkování proti tuberkulóze (na základě dlouhodobě klesající incidence), musí mít zdravotníci i veřejnost stále povědomí o tom, že toto onemocnění se v České republice vyskytuje a že na území jiných států může představovat závažný problém. Tuberkulóza je celosvětově neustále monitorována hlavně kvůli svojí epidemiologické závažnosti a také zmutovaným rezistentním kmenům, které představují velký problém při terapii onemocnění.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo porovnání dvou nejužívanějších metod stanovení citlivosti k základním antituberkulotikům (streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamid). Soubor 275 patientských vzorků byl zpracován ve FN Plzeň v Laboratoři pro diagnostiku mykobakterií porovnávací metodou dle Canettiho a testováním citlivosti v uzavřeném systému Bactec MGIT 960. Včasné a správné určení citlivosti je velice důležité pro následnou cílenou terapii.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MYKOBAKTERIE

2.1.1 Vlastnosti mykobakterií

Mycobacterium tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum* a některé zvířecí druhy se díky genetické blízkosti řadí společně do jedné skupiny, která je nazývána *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Jde o obligátně patogenní druh bakterií patřících do rodu *Mycobacterium*, čeledi *Mycobacteriaceae*, do podřádu *Corynebacterineae* a řádu *Actinomycetales*. Bakterie, které se řadí do rodu *Mycobacterium*, mají zvláštní vlastnosti (1; 2):

- kultivační – vyznačují se velice pomalým růstem, a to i pokud se kultivují na speciálních půdách
- morfologické - barvením podle Grama je nelze obarvit běžným postupem
- patogenní
- terapeutické - na rozdíl od ostatních bakterií se k terapii používá jiný druh antimikrobiálních látek (3).

2.1.2 Chemické složení mykobakterií

U mykobakteriálních buněk rozlišujeme 3 základní buněčné struktury: cytoplasmu s organelami, cytoplasmatickou membránu a buněčnou stěnu.

V cytoplasmě, protkané sítí jemných fibril, je uložený nukleoid bez membrány. Dále jsou přítomna četná granula, která obsahují glykogen a ostatní energetické

substance. Kromě vody, solí, enzymů a meziproductů látkové výměny jsou zde ve velkém množství proteiny a také ribozomy.

Cytoplasmatická membrána má jako hlavní funkci transport látek do bakterie a z bakterie. Obsahuje velké množství fosfolipidů a je trojvrstvá.

Buněčná stěna obsahuje peptidoglykany, polysacharidy a kyselinu mykolovou, je to makromolekulární komplex (4).

Mykobakterie obsahují anorganické látky a organické látky, mezi které patří lipidy, polysacharidy a proteiny. Největší podíl obsahu tvoří voda, asi 60 %. Chemickou frakcionací lze proteiny rozdělit do čtyř skupin (A, B, C, D) a polysacharidy do tříd I. a II. Do I. třídy polysacharidů se řadí galaktózy, manózy a arabinózy, do třídy II. se řadí glukán. Obsažené lipidy v zevní vrstvě buněčné stěny jsou složeny z fosfolipidů, glykolipidů, vosku D a mykolových kyselin. Lipidy mykobakterií mají svou důležitou funkci, a to snižování mykobaktericidní aktivity alveolárních makrofágů, dále mají význam ve své toxicitě pro hostitele, protože jsou charakteristickým znakem virulentních a nevirulentních druhů mykobakterií. Tyto lipidy se nevyskytují nikde v přírodě, jejich složení je velice speciální a specifické (2; 3; 5).

Proti běžným imunitním mechanismům a proti vnějším vlivům vykazují tyto bakterie značnou odolnost (1).

Název rodu *Mycobacterium* pochází již z roku 1886. Podle vzhledu kolonií a díky jejich pomalému růstu na kultivačních půdách byla patrná zdánlivá podobnost s plísněmi. S nimi ale nemají nic společného. *Mycobacteria* jsou příbuzná rodům *Nocardia* a *Corynebacterium*, a to kvůli vysokému obsahu cytosinu a guaninu, které obsahují jejich deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (3).

Do rodu *Mycobacterium* je zahrnováno více než 150 druhů mykobakterií (6), z nichž obligátně patogenní pro člověka jsou jen zástupci komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, některé druhy jsou potenciálně patogenní a ostatní jsou běžně se vyskytující mikroorganismy v okolním prostředí, které jsou zcela neškodné. (7).

2.2 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

2.2.1 Historie *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis bylo objeveno zásluhou Roberta Kocha, který se o nález etiologického agens tuberkulózy poprvé zmínil a podrobně jej popsal 24. března 1882 v Berlíně, kde se konala schůze Fyziologické společnosti. Na této schůzi dále Robert Koch přednesl tři postuláty, které by měly být splněny k jasnému prokázání souvislosti mezi určitým onemocněním a určitým mikroorganismem. V klinické praxi, ale i v odborné literatuře, se dodnes užívá pro *Mycobacterium tuberculosis* označení „bacil Kochův“ (2; 7).

2.2.1.1 Robert Koch

Robert Koch žil v letech 1843 – 1910. Německý lékař a mikrobiolog, jeden z hlavních zakladatelů oboru mikrobiologie, se zasloužil o zavedení kultivačních pěstí s obsahem agaru, dokázal prokázat bakteriální původce některých infekčních onemocnění.

- 1876 – patogenita a původce antraxu
- 1882 – původce tuberkulózy
- 1883 – původce cholery

V roce 1905 bylo jeho celoživotní dílo oceněno Nobelovou cenou za fyziologii a lékařskou práci o tuberkulóze (8).

2.2.1.1.1 Kochovy postuláty

Kochovy postuláty:

1. mikroorganismus musí být nalezen v každém případě onemocnění
2. mikroorganismus nesmí být nalezen jako nahodilý nebo neškodný parazit při jiném onemocnění
3. mikroorganismus musí po izolaci a kultivaci vyvolat po aplikaci hostiteli v čisté kultuře totéž onemocnění (2).

2.2.2 Historie tuberkulózy

Tuberkulóza je jedna z nejstarších chorob lidstva, jak o tom svědčí archeologické kosterní nálezy. První a tudíž nejstarší důkaz o její existenci pochází již z doby neolitické (mladší doba kamenná). Onemocnění tuberkulózou činilo problém vlastně v každé době, a proto jsou ze všech dob a různých říší o ní zaznamenány i písemné doklady. Nejstarší písemný doklad se nachází v nejstarším zákoníku světa babylonského krále Chammurábiho (asi 2200 let př. n. l.) (9). Její výskyt byl také prokázán v Egyptě v období V. dynastie faraonů, ve starém Řecku, v Říši římské, u Babyloňanů, u Židů, ve staré Indii atd. Tuberkulóza byla jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve středověku, ale i v novověku. Ještě dnes je patrné rozšíření tuberkulózy v rozvojových zemích, vůbec nejhorší situace je v jihovýchodní Asii (Indie, Čína) a v Africe (2; 5).

2.2.3 Význam *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis má veliký význam v patogenezi člověka, protože patří mezi jeho nejdůležitější patogeny. Tento patogen je velice rozšířený v lidské populaci, je jím nakažena až jedna třetina populace a během života se příznaky tuberkulózy projeví až u 10 % těchto infikovaných osob. Podle Světové zdravotnické organizace

jsou tímto onemocněním na celém světě infikovány až dvě miliardy populace. Mortalita způsobená tímto patogenem činí ročně asi 3 miliony nemocných (3).

2.2.4 Epidemiologie *Mycobacterium tuberculosis*

Člověk, který má otevřenou tuberkulózu, je hlavním zdrojem nákazy *Mycobacterium tuberculosis*. Nemocný své okolí infikuje vykašláváním infekčního aerosolu. Tuberkulóza ve střední Evropě je onemocněním týkající se nejvíce přistěhovalců, žadatelů o azyl a rizikových skupin, jako jsou drogově závislí, bezdomovci, lidé v nápravných zařízeních atd. (3).

Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky vydává každoročně již od roku 1960 publikaci „Tuberkulóza a respirační nemoci“, kde je možné nalézt veškeré informace týkající se tohoto onemocnění, ať už se jedná o incidence, mortalitu, dobu léčby, dobu trvání hospitalizace, vznik lékových rezistencí atd. (10).

Dle zdravotnické statistiky vydávané Ústavem zdravotnických informací a statistiky ČR byla situace v roce 2012 následující:

- 611 onemocnění (incidence 5,8 onemocnění/100 000 obyvatel) – jedná se o všechny formy, lokalizace a recidivy tuberkulózy
- z toho 402 mužů, 209 žen
- 552 nemocných mělo tuberkulózu plic, 59 nemocných mělo mimoplicní tuberkulózu
- největší výskyt v Praze (12,3/100 000 obyvatel), vyšší výskyt v kraji Ústeckém (6,6/100 000 obyvatel), Zlínském (6,3/100 000 obyvatel) a Jihomoravském (6,2/100 000 obyvatel)
- nejmenší výskyt v kraji Jihočeském (2,0/100 000 obyvatel)
- 45 nemocných bezdomovců
- 105 nemocných narozených mimo Českou republiku

- u 14 nemocných byla prokázána monorezistence, u 5 nemocných multirezistentní kmen, tj. rezistence současně k isoniazidu a rifampicinu, u 8 nemocných polyrezistence (rezistence k více než jednomu antituberkulotiku, ale ne současně k rifampicinu a isoniazidu)
- mortalita byla u 0,2/100 000 obyvatel, tj. 22 zemřelých z celkového počtu případů. Žádný z nich nebyl léčen antituberkulotiky.

V roce 2012 byla epidemiologická situace TBC v ČR příznivá, obraz výskytu TBC zůstal v České republice téměř nezměněn od roku 2011. V porovnání s rokem 1989 má prevalence tohoto onemocnění klesající trend. ČR se s hlášenou incidencí 5,8/100 000 obyvatel za rok 2012 řadí k zemím s nejnižším výskytem TBC v Evropě (10).

Zdravotnická statistika, vydávaná Ústavem zdravotnických informací a statistiky ČR, je tvořena na základě dvou systémů povinného hlášení případů tuberkulózy:

- Informační systém bacilární tuberkulózy (ISBT)
- Registr tuberkulózy (RTBC).

2.2.4.1 Informační systém bacilární tuberkulózy

Informační systém bacilární tuberkulózy řádně vyplňují, bez ohledu na zřizovatele, všechny mykobakteriologické laboratoře. Je to systém hlášení veškerých pozitivních výsledků mykobakteriologických vyšetření z jednotlivých laboratoří. K jednotlivým pozitivním nálezům jsou také získávána a přiřazována základní data o jednotlivých pacientech. Tento systém má ještě další důležitou funkci, která spočívá ve využití všech těchto získaných dat ke kontrole souboru dat pro registr tuberkulózy (11).

2.2.4.2 Registr tuberkulózy

Registr tuberkulózy řádně vyplňují, bez ohledu na zřizovatele, odborní lékaři pneumologie a ftizeologie. Je to jeden z prioritních registrů Ministerstva zdravotnictví.

Jde o informace o nových, ale i recidivujících onemocnění tuberkulózou nebo jinou mykobakterií. Shromažďuje údaje, jako jsou identifikace pacienta, druhy vyšetření, diagnóza, průběh léčby, příslušnost pacienta k rizikovým skupinám, očkování atd. (12).

Oba tyto systémy, na jejichž vzniku se podílejí pracovníci oboru pneumologie, ftizeologie a laboratorní diagnostiky mykobakterií svou každodenní prací, mají velkou cenu pro sestavování takovýchto statistik. Jejich vzájemná provázanost přispívá ke kontrole validity a úplnosti dat o tuberkulóze (13).

2.2.4.3 Výskyt tuberkulózy ve světě

Podle údajů Světové zdravotnické organizace, je seznam států s vyšším výskytem tuberkulózy k 17. 11. 2013 následovný:

- Evropa: Bělorusko, Bosna a Hercegovina, Litva, Lotyšsko, Moldávie, Rumunsko, Rusko a Ukrajina
 - Asie: všechny státy mimo Bahrajnu, Írán, Izraele, Japonska, Jordánska, Kuvajtu, Libanonu, Ománu, Saudské Arábie, Spojených arabských emirátů, Sýrie a Turecka
 - Afrika: všechny státy mimo Egypta, Komorského svazu, Libye, Mauricia, Seychel a Tuniska
 - Amerika: Bolívie, Brazílie, Dominikánská republika, Ekvádor, Guatemala, Guyana, Haiti, Honduras, Panama, Paraguay, Peru a Surinam
- Austrálie a Oceánie: Kiribati, Marshallovy ostrovy, Mikronésie, Nauru, Papua-Nová Guinea, Šalamounovy ostrovy, Tuvalu a Vanuatu (14).

2.2.5 Morfologie *Mycobacterium tuberculosis*

Bakterie druhu *Mycobacterium tuberculosis* jsou obligátně aerobní, nepohyblivé a nesporulující. V mikroskopickém obraze jsou středně velké, vypadají jako velice štíhlé rovné nebo mírně zahnuté tyčinky, s oblými konci, délky 1 až 5 mikrometrů a šířky 0,5 mikrometru (2; 7).

Obsahují tzv. Muchova granula, která způsobují nepravidelné probarvení tyčinky, a proto někdy svým vzhledem mohou připomínat korálky. Jednotlivě nebo v podobě shluků několika paralelně uspořádaných tyčinek se vyskytují v preparátech zhotovených z klinických materiálů. Pozorujeme-li pod mikroskopem shluky paralelně uspořádaných tyčinek, tedy spletené provazce (cording), jde o typický jev pro virulentní kmeny. Takovýto obraz se naskytne při pozorování preparátu, který byl vyhotovený z kultury, zejména v tekutém kultivačním médiu. Od ostatních mykobakteriálních druhů se odlišují svými specifickými růstovými vlastnostmi a pomocí biochemických testů (1; 3).

Pokud je preparát obarven podle Grama, mykobakterie se nezobrazí, je to způsobené přítomností mykolových kyselin v zevní vrstvě buněčné stěny mykobakterií. Proto se tyto bakterie označují jako silně acidorezistentní a je tedy nezbytné barvit je speciálními barvicími technikami (1).

2.2.6 Odolnost vůči zevním vlivům

Vůči vyschnutí je *Mycobacterium tuberculosis* velice odolné, například vydrží až 8 měsíců ve vyschlém sputu, až 10 dnů vydrží *Mycobacterium tuberculosis* v prachu.

Mycobacterium tuberculosis odolává velkému množství druhů dezinfekčních prostředků. Spolehlivě fungují aldehydy a deriváty fenolu, oxidační činidla pouze některá, a to při delší expozici a ve vysokých koncentracích. Pokud je to možné, tak se právě kvůli vysoké odolnosti mykobakterií provádí dezinfekce a následné autoklávování všeho odpadního materiálu před odstraněním z laboratorního provozu. Velmi citlivá jsou mykobakteria k UV-záření, proto se ho využívá k dekontaminaci povrchů (1; 3).

2.2.7 Zdroj a přenos infekce

Hlavním zdrojem nákazy je člověk vylučující *Mycobacterium tuberculosis*, ve výjimečných případech mohou být zdrojem hospodářská a domácí zvířata. Infekce alimentární cestou byla v roce 1968 eliminována v rámci celého státu likvidací infikovaného skotu (2).

2.2.7.1 Inhalace

Nejběžnější nejvíce se vyskytující přenos infekce je cesta inhalační, a to kapénkovou formou, kdy jsou při blízkém kontaktu s nemocným člověkem vdechovány mykobakterie, které se zachytávají v aerosolu bronchiálního sekretu. Dále suchou cestou, kdy dochází k inhalaci infikovaného zvířeného prachu. Poslední možnost je přenos přímo vzduchem, kdy se mykobakterie z odpařené kapénky sputa dlouho volně vznášejí ve vzduchu a mohou se tak šířit do velkých vzdáleností anebo se také usazují na různých předmětech (2; 5).

2.2.7.2 Přímý kontakt

Dalším možným způsobem přenosu je přímý kontakt, většinou profesionálního charakteru, kdy se může infekce přenést třeba na kůži osob, přicházejících s infikovaným materiálem do kontaktu, což se týká převážně zdravotníků v laboratořích, plicních ambulancích, pitevnách, veterinárních pracovníků nebo i zaměstnanců jatek. (2; 5).

2.2.7.3 Ingesce

Jedná se o přenos alimentární cestou, pokud dojde k požití infikovaných potravin nebo při nedodržování hygienických zásad, kdy bez patřičné dezinfekce zdravý člověk použije osobní věc člověka nemocného (5).

2.2.7.4 Přenos hematogenní

Takovýto přenos je nejméně se vyskytující. Byl by to přestup infekce z matky na plod pupečnickovými cévami, nebo vpravení infekce přímo do krevního oběhu (2; 5).

2.2.8 Prevence infekce *Mycobacterium tuberculosis*

Prevence onemocnění tuberkulózou spočívá v časném záchytu nemocných s otevřenou tuberkulózou, jejich důsledné léčbě a včasné izolaci, aby nedocházelo k dalšímu infikování blízkého okolí, dále také v aktivním vyhledávání nově nakažených osob hlavně v již zmíněných rizikových skupinách (3).

Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučuje léčebnou strategii pro záchyt a léčbu - DOTS (Directly Observed Treatment, Short Course). Tato strategie byla představena v roce 1991. Jedná se o původní systém pro léčbu tuberkulózy, který je založený na přesné diagnostice a úplném podání antituberkulotik. V rámci zdravotnických programů byla DOTS zhodnocena Světovou bankou jako jedna z finančně nejefektivnějších (15).

Důležitou součástí prevence byla také vakcinace, která je ale z důvodu velmi nízkého výskytu tuberkulózy od roku 2011 v ČR zrušena. Ke kalmetizaci neboli očkování se proti tomuto onemocnění používala vakcína z oslabeného kmene *Mycobacterium bovis*, tzv. BCG-vakcína (Bacille Calmette-Guerin). Vakcína se očkovala do podkoží již v novorozeneckém věku a další přeočkování se provádělo

v případě negativity tuberkulínového kožního testu podle Mantouxové v 11 letech dítěte (3).

V dnešní době je tedy očkování proti tuberkulóze čistě jen na uvážení rodičů. Tuberkulóza je však velmi závažné onemocnění, které by naše populace neměla v žádném případě podceňovat.

Tuberkulóza je vysoce infekční onemocnění, při kterém je nutná izolace pacienta na specializovaných lůžkových odděleních nemocnic, a jejíž léčba je povinná. Včasná detekce, analýza a adekvátní léčebné zajištění všech zdrojů tuberkulózy výrazně napomáhají zabránění dalšího případného šíření tohoto onemocnění v celém světě (3).

2.2.9 Patogeneze *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis žádné toxiny, které by se mohly považovat za patogenní faktory, netvoří. Přítomnost mykolových kyselin v buněčné stěně brání fagocytóze a působí jako jeden z hlavních faktorů patogenity, je to takzvaný cord factor. Mykolové kyseliny jsou mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, který je tvořený 60 – 90 uhlíkovými atomy. Cord factor odpovídá za růst virulentních kmenů v provazcích, chemicky se jedná o trehaloso-6,6'-dimykolát. *Mycobacterium tuberculosis* je schopné přežít u neimunního jedince uvnitř makrofágů, tím je dána jeho virulence. Mykobakterie potlačují ve fagosomech snižování pH a dále pak potlačují splývání fagosomů s lysosomy. Do krve a orgánů se mykobakterie dostávají z oblastních mízních uzlin, kam se přemísťují pomocí makrofágů z počátečního místa vstupu. Při vstupu mykobakterií do makroorganismu vzniká typická reakce pozdní přecitlivělosti makroorganismu na mykobakteriální antigeny, dochází ke vzniku příznaků a dále k poškození organismu (1; 3).

2.2.9.1 Primární tuberkulóza

Ve většině případů jsou vstupní branou infekce do organismu plicní alveoly, v menší míře potom zažívací trakt a vzácně také kůže. V neimunním makroorganismu, tedy na začátku infekce, se mykobakterie, které byly pohlceny plicními makrofágy, uvnitř těchto makrofágů množí a přežívají zde, dále jsou zanášeny do hilových lymfatických uzlin. Určitá část mykobakterií hyne například účinkem vitamínu D, dochází k jejich štěpení a molekuly HLA II. třídy nesou na svých molekulách jejich antigenní polypeptidy a prezentují je na povrchu makrofágů. Pokud na tuto antigenprezentující buňku narazí specifický T lymfocyt, dojde k aktivaci specifické imunitní reakce, následnému namnožení klonu T lymfocytů a diferenciaci efektorových Th1 lymfocytů. Efektorové Th1 lymfocyty nesou znak CD4+ a po aktivaci uvolňují interleukin 2, interleukin 12 a interferon gama, které dále působí na makrofágy a chemokiny, přitahující do místa vstupu další lymfocyty a monocyty. Z ložiska vzniká granulom spojením makrofágů v mnohjaderné obrovské buňky. Pokud je granulom velký, může docházet k jeho kazeifikaci, což je stav, kdy granulom dostává sýrovitý vzhled, protože jeho střed nekrotizuje. Množení mykobakterií se výrazně zpomaluje několik týdnů po začátku infekce působením buněčné imunity, kterou tvoří hlavně cytotoxické buňky nesoucí znak CD8+. Tyto Tc lymfocyty ničí infikovaný fagocyt obsahující množící se mykobakterie svými perforiny, pomocí enzymu granulolyzinu (3; 16).

Primární tuberkulózní komplex je tvořen primárním ložiskem a infikovanou regionální lymfatickou uzlinou. V orgánech vznikají ložiska generalizací infekce z primárního komplexu. K velkým ložiskům se makrofágy nemohou dostat, protože se ložiska opouzdřují vazivem. Postupem času se začínají hojit, ale i tak uvnitř část mykobakterií přežívá a proces v ložisku se může kdykoli obnovit. Může nastat miliární rozsev, a to v případě, že se mykobakterie v tomto stádiu dostanou do oběhu a způsobí v orgánech mnohočetné granulomy (3; 7).

2.2.9.2 Postprimární tuberkulóza

S odstupem času, třeba i za několik desítek let, může nastat postprimární tuberkulóza, a to po exogenní reinfekci nebo reaktivací starého ložiska. Hlavním znakem je chronický průběh především orgánového postižení, jelikož organismus byl už před onemocněním senzibilizován a buněčný imunitní systém je stimulován opakovaným kontaktem s *Mycobacterium tuberculosis*. Sklony k opětovnému vybuzení mají osoby s podlomenou imunitou, což je způsobené například infekcí HIV, pokročilým věkem, při abusu alkoholu a drog. Průběh postprimární tuberkulózy vypadá tak, že se v plicním hrotu vytvoří velký, uvnitř kolikvující a stále rostoucí tuberkulom, který s postupem času perforuje a vyprázdňuje se do nedalekého bronchu. Ve vzniklé plicní dutině se hojně množí mykobakteria, která se pak snadno dále rozšiřují v plicích, dostanou se do laryngu, střev, sputa a tak při kašli dochází k přenosu infekce na dalšího nového hostitele. Stav, kdy se mykobakterie nacházejí ve sputu, se nazývá otevřená tuberkulóza a jedná se o vůbec nejrizikovější stádium, jelikož takový nemocný je hlavním zdrojem nákazy onemocnění pro své okolí (3; 7).

2.2.10 Patogenita *Mycobacterium tuberculosis*

Onemocnění způsobené infekcí *Mycobacterium tuberculosis* se nazývá tuberkulóza. Vznik onemocnění je závislý na úrovni odolnosti nakaženého jedince a hlavně také na velikosti infekční dávky. Přibližně 5 % osob nakažených touto infekcí onemocní do dvou let od vstupu infekce. Desítky let po infekci nebo jindy během života onemocní dalších 5 % nakažených osob (3).

Primární tuberkulóza a postprimární tuberkulóza patří mezi onemocnění téměř výhradně plicní, která se projevují specifickými příznaky, jako jsou vyšší tělesná teplota, ubývání na váze, pocení v noci, kašel s produkcí sputa a také hemoptýza (vykašlávání krve), která je způsobená destrukcí tkání (3).

2.2.11 Klinické vzorky

Hlavní předpoklad správného a kvalitního mykobakteriologického vyšetření je vzorek klinického materiálu, který byl správně odebraný. Tento materiál se odebírá do vhodných sterilních odběrových nádobek. Samozřejmostí je opatrnost při transportu vzorku do laboratoře z důvodu znehodnocení vzorku nebo snad ohrožení okolí. Aby bylo vyšetření co nejvíce výtěžné, musí být druh odebraného materiálu adekvátní formě a lokalizaci onemocnění. Je důležité, aby první nejlépe tři odběry byly provedeny ještě před zahájením léčby antituberkulotiky (17).

Validním vzorkem ke zpracování na přítomnost *Mycobacterium tuberculosis* je biologický materiál z dolních cest dýchacích, hlavně sputum odebírané 3 dny za sebou, ráno na lačno, před hygienou dutiny ústní. U nemocných, kteří nespolupracují (malé děti, staří lidé, osoby s psychiatrickým onemocněním), je možné místo odběru sputa provést laryngeální výtěr. Odebírá se také ráno na lačno, před hygienou ústní dutiny, a to třemi laryngeálními výtěrkami (vyrobeny z chrommolybdenového drátu) bez transportního média. Takovýto materiál ale není pro průkaz mykobakterií nejvhodnější volbou kvůli nízké citlivosti a poměrně dosti vysokému riziku přenesení infekce při odběru. Dále lze vyšetřit i jiný biologický materiál jako např. bronchoalveolární laváž, pleurální výpotek, punktát, plicní tkáň, mozkomíšni mok, stěry a výtěry z píštělí, hnisavých procesů nebo ran, žaludeční šťávu a moč (3; 17).

2.2.12 Bezpečnost práce

Mycobacterium tuberculosis patří mezi velice nebezpečné bakterie, jelikož infekční dávka pro člověka je méně než 10 bacilů. Riziko profesionální infekce je velmi vysoké, proto je důležité co nejvíce zabraňovat vzniku infekčního aerosolu a vyvarovat se jeho inhalaci. Každý klinický materiál určený k mikrobiologickému zpracování je potenciálně infekční. Tudíž při práci s takovýmto materiálem je nutné používat

bezpečnostní biohazardní boxy a ochranné pracovní pomůcky (rukavice, roušky atd.) (3).

2.2.13 Laboratorní průkaz

Laboratorní diagnostika TBC je komplexní proces, skládající se z několika fází a metod. Základem je diagnostika přímá. Zlatým standardem je průkaz mikroskopický a kultivační, což jsou klasické postupy průkazu přímého. Dále lze použít i moderní metody průkazu např. genetické (průkaz specifických sekvencí nukleových kyselin a podobně) (3).

2.2.13.1 Mikroskopie

Při pozitivitě mikroskopického vyšetření na průkaz acidorezistentních tyčinek z infekčního materiálu nelze konstatovat, že se jedná o tuberkulózu (mikroskopie není specifická pouze pro mykobakterie, mohou se takto prokázat např. nokardie), také nelze posoudit životaschopnost pozorovaných mykobakterií. Mikroskopicky je totiž možné prokázat i biologicky inaktivní mykobakterie, které ale nemusí být kultivačně pozitivní vlivem již zahájené terapie. Mikroskopicky pozitivní nález by měl být potvrzen i kultivačně. Záchyt acidorezistentních tyčinek v přímém nátěru je zapotřebí hodnotit vždy ve vztahu ke klinickému obrazu nemocného. Nicméně je toto vyšetření pro časnou diagnostiku velice cenné, pro svou rychlost, jednoduchost a finanční nenáročnost. Nemocná osoba, která je mikroskopicky pozitivní, je nejzávažnějším zdrojem infekce tuberkulózy (2; 3).

Mezi nejvíce používané barvicí techniky patří:

- metoda dle Ziehl-Neelsena
- fluorescenční barvení.

2.2.13.1.1 Barvení dle Ziehl-Neelsena

K obarvení acidorezistentních tyčinek se často používá metoda podle Ziehl-Neelsena. Preparáty se barví za horka (ohřívání kahanem zespodu), třikrát do výstupu par přefiltrovaným karbolfuchsinem, následuje diferenciací kyselým alkoholem a nakonec se dobarvuje malachitovou zelení. Výsledkem tohoto barvení jsou růžové až červené acidorezistentní tyčinky na zeleném podkladě (Příloha 1). Odečet preparátu se provádí meandrovitým prohlížením nejméně padesáti zorných polí a případná pozitivita vzorku se hodnotí semikvantitativně na křížky. Toto barvení se užívá jako statimové (2; 3).

2.2.13.1.2 Fluorescenční barvení

Jako screeningová barvicí metoda je používáno fluorescenční barvení fluorochromy - směsí auraminu O a rhodaminu. Výsledkem této barvicí metody při prohlížení preparátů fluorescenčním mikroskopem jsou zářivé žlutozelené až stříbřité tyčinky na tmavě červeném pozadí (Příloha 2). Preparát se odečítá také meandrovitě, a to v rozsahu dvaceti pěti zorných polí, hodnocení je taktéž semikvantitativní na křížky. Fluorescenční barvení se odečítá při menším zvětšení. Pokud jsou nalezeny podezřelé útvary, preparát se přebarvuje dle Ziehl-Neelsena (2; 3; 18).

2.2.13.2 Kultivace *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis se množí pomalu, generační doba je dlouhá 18 až 24 hodin, proto je také dlouhodobá i samotná kultivace těchto bakterií.

Důležitou a nedílnou součástí zpracování klinického materiálu na průkaz mykobakterií je dekontaminace vzorku. Dekontaminace je nutná pro zneškodnění ostatní nesespecifické mikroflóry, kterou každý vzorek obsahuje, jelikož tato mikroflóra přerůstá mykobakterie na kultivačních půdách a její produkty mohou také potlačovat růst mykobakterií. Kultivace může být takto rychle znehodnocena. Dekontaminační roztoky a postupy jsou různé. Základní dekontaminační metodou je modifikovaná metoda dle Petroffa nebo metoda s N-acetyl-L-cysteinem (použití 4% NaOH + 0,9% citronanu sodného). Možný je i postup podle metody s laurylsulfátem sodným (3; 17).

Kultivace se provádí na pevných nebo tekutých kultivačních půdách.

2.2.13.2.1 Kultivace v tekutých půdách

V tekutých médiích (Šulova půda s glycerinem, Middlebrook) roste *Mycobacterium tuberculosis* nejčastěji ve formě drobných zrněk. V dnešní době se používá metabolická kultivace, která je založena na průkazu produktů metabolismu mykobakterií během jejich růstu v tekutých půdách v poloautomatických systémech. Metabolická kultivace se provádí v různých přístrojích - např. BACTEC® MGIT™ 960 (Příloha 3), kde se používají tzv. zkumavky MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) s tekutým selektivním médiem Middlebrook, na jejichž dně jsou zabudované oxygenové senzory. Je detekována spotřeba kyslíku rostoucími mykobakteriemi, tím dochází ke zvýšení intenzity jasně oranžové fluorescence terčíku, hodnocené při 365 nm na UV transluminátoru. K tomuto proměřování zde dochází po celou dobu inkubace v pravidelných intervalech, celková inkubace trvá 42 dnů. Případný pozitivní výsledek je přístrojem ihned signalizován. Nárůst mykobakterií v moderních poloautomatických systémech bývá zaznamenán už 10. až 14. den od inokulace (1; 3; 17).

2.2.13.2 Kultivace na pevných půdách

Na pevných vaječných půdách Ogawa nebo Löwenstein-Jensen se zaznamenává nárůst během 3 až 9 týdnů. Tyto půdy jsou speciálně obohaceny pro optimální růst mykobakterií. Jejich základem je přidavek malachitové zeleně, která má funkci inhibice růstu ostatní nespecifické mikroflóry, a další nezbytnou složkou těchto kultivačních půd je teplem koagulované vejce (19).

Pevné půdy se průběžně odečítají ve 3., 6. a 9. týdnu inkubace. Vzhled kolonií *Mycobacterium tuberculosis* na pevných kultivačních půdách je drsný květákovitý či bradavčitý (tzv. R kolonie), mají nepravidelný okraj a drolivou konzistenci, barva kolonií je krémová nebo nažloutlá (Příloha 4). Při zachycení nárůstu takovýchto kolonií, se provede identifikace kultury a nahlásí se pozitivní výsledek. Dále se provede vyšetření citlivosti k antituberkulotikům (1; 3).

2.2.13.3 Identifikace *Mycobacterium tuberculosis*

Každý izolovaný kmen se musí identifikovat. *Mycobacterium tuberculosis* má sice velice charakteristický růst na pevných půdách, ale identifikace musí být potvrzena i dalšími jinými způsoby, jako jsou například biochemické testy (produkce niacinu, redukce nitrátů) nebo určení pomocí genetických metod (genové sondy, sekvenace genu pro 16S ribozomální RNA, atd.) (3). Identifikaci lze provádět i dalšími moderními metodami jako např. pomocí hmotnostní spektrometrie.

2.2.13.4 Moderní metody

Genetické metody, jejichž cílem je přímý průkaz mykobakterií ve vzorcích biologického materiálu po amplifikaci sekvencí nukleových kyselin, jsou vysoce specifické a senzitivní (3).

Nejčastěji využívané komerční soupravy:

- Gen-Probe AMTD test – k detekci rRNA komplexu *Mycobacterium tuberculosis*
- Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test – polymerázová řetězová reakce (PCR) k namnožení specifických úseků DNA
- LCx Probe System – ligázová řetězová reakce (LCR).

2.2.13.5 Testování citlivosti *Mycobacterium tuberculosis*

Nedílnou a zásadní součástí laboratorní diagnostiky je stanovení citlivosti. Provádí se u každého kmene, který byl nově izolován. Při přetrvávající pozitivitě pacienta je vhodné po třech či více měsících (nebo podle dohody s ošetřujícím lékařem) vyšetření citlivosti zopakovat.

Při prvním vyšetření citlivosti se určuje citlivost na základní antituberkulotika, což jsou streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol a pyrazinamid. Pokud je zapotřebí, např. u rezistentních kmenů, či po dohodě s ošetřujícím lékařem, provádí se testování citlivosti rozšířené i na další léčiva tzv. antituberkulotika a antibiotika druhé řady, např.: fluorochinolony, aminoglykosidy, rifabutin, ethionamid, capreomycin, cykloserin, kyselinu paraaminosalicylovou atd.

Metoda stanovení citlivosti mykobakterií se liší od testování prováděného v klasické bakteriologii. Určování citlivosti se jako součást nadstavbové diagnostiky provádí ve specializovaných mykobakteriologických laboratořích (3; 17).

Pro testování citlivosti se využívají tzv. kritické koncentrace testovaných léků (antituberkulotik). Tyto koncentrace představují nejnižší koncentraci léku inhibující kmene, které nikdy nebyly v kontaktu s antituberkulotikem (tzv. divoké kmene) u pacientů reagujících na léčbu klinickým zlepšením. Tyto koncentrace uveřejňuje a doporučuje WHO a ECDC (European Center for Disease Prevention and Control).

Obecně lze říci, že standardizace metod pro testování citlivosti *Mycobacterium tuberculosis* je obtížná z důvodu rozdílné účinnosti jednotlivých léčiv v různých typech médií a v různých metodách (20).

2.2.13.5.1 Metody testování citlivosti *Mycobacterium tuberculosis*

1. Konvenční metody na pevných kultivačních médiích (vaječných nebo agarových)

Tyto metody jsou standardizované pro široké klinické použití. Jejich výhodou je ekonomická dostupnost, ale nevýhodou dlouhá doba inkubace (3-4 týdny). Nejvíce používaná je metoda proporční.

- a. Proporční metoda (proporční metoda dle Canettiho bude popsána podrobně dále)
- b. Metoda absolutních koncentrací
- c. Metoda tzv. míry rezistence – Resistance Ratio Method

2. Rychlé metody testování citlivosti v poloautomatickém systému (v uzavřeném systému)

Tyto metody využívají detekci metabolické aktivity rostoucích mykobakterií (spotřeba kyslíku - BACTEC[®] MGIT[™] 960; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, VersaTREK; TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH, USA, resp. produkce CO₂ – BACTEC 460 a MB/BacT; bioMerieux, Marcy L'Etoile, France). Jejich výhodou je významné zkrácení doby vyšetření (cca 5-10 dní).

Pozn.: Od dříve často používaných radiometrických systémů se v poslední době již ustupuje kvůli vysokému riziku práce s radioaktivními látkami a nákladnosti jejich likvidace.

3. Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) mikrodiluční metodou

Využívá se i ke stanovení citlivosti na antituberkulotika a antibiotika druhé řady. Provádí se v plastových mikrotitračních destičkách s 96 jamkami. V jamkách jsou mikropipetou rozplněna testovaná léčiva naředěná geometrickou řadou. V jedné destičce je možné otestovat jeden kmen ve dvou různých ředěních až na 6 léčiv. Hodnotí se kvantita růstu mikrokolonií v přítomnosti testovaného léku ve srovnání s kontrolou bez léčiva. Jako minimální inhibiční koncentrace se označuje nejnižší koncentrace léku, ve které došlo k inhibici růstu (17).

Mikrodiluční metoda je výhodná pro možnost rozšířeného testování léků ve velkém rozsahu koncentrací léků, lze takto testovat termolabilní léky. Spotřeba Šulovy tekuté půdy a substancí je minimální, je zde i relativně krátká inkubační doba (14 dní). Nevýhodou je časově náročná příprava destiček (17).

4. Kolorimetrické detekční metody

- a. založené na redoxních indikátorech, např. resazurin mikrotitrační test (REMA)
- b. založené na tetrazoliových solích
- c. založené na testu nitrátoreduktázy (NRA – Nitrate Reduction Assay)

Využití schopnosti *Mycobacterium tuberculosis* redukovat nitráty na nitrity a detekce barevné změny (21)

5. MODS (Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay)

Je detekován typický růst *Mycobacterium tuberculosis* (tvorba provazců) v jamkách destičky bez nebo s daným antituberkulotikem v inverzním světelném mikroskopu.

6. Fágové metody

Využívají principu replikace mykobakteriofága pouze v živých mykobakteriálních buňkách (FASTPlaque™, Biotech Labs Ltd.)

7. Metoda Etestů

Gradient 15 koncentrací antimikrobní látky na plastovém stripu (široce s úspěchem využívaný pro testování citlivosti nespecifických bakterií) je pro *Mycobacterium tuberculosis* teprve ve fázi zkoušení. Podle posledních výsledků by mohl být použitelný pro RIF a INH (20).

8. Genetické metody

Detekce genetických mutací souvisejících s rezistencí k antituberkulotikům. Tyto metody jsou vysoce specifické a senzitivní, jejich provedení je rychlé, některé z nich lze provádět i rovnou z klinického vzorku materiálu. Jejich nevýhodou je vysoká finanční náročnost. Komerční sety se využívají k detekci mutací zjm. u RIF a INH, dále pak u PZA, STM, EMB, amikacinu, fluorochinolonů apod. Využívají se amplifikační techniky např. PCR.

9. Další metody (méně používané v praxi)

a. Růst na membránách (Anopore)

Testování RIF a INH, odečet fluorescenčním nebo elektronovým mikroskopem

b. TLA (Thin Layer Agar)

Testování na tenké vrstvě agaru (pro RIF a INH) (20; 22).

2.2.13.5.1.1 Stanovení citlivosti proporční metodou

Principem proporčního testu podle Canettiho je porovnávání počtu narostlých kolonií *Mycobacterium tuberculosis* na kontrolních půdách bez antituberkulotika s počtem kolonií, které vyrostly na půdách s obsahem kritické koncentrace testovaného léku (Příloha 5). Kmen se hodnotí jako rezistentní při jejich proporci, tedy podílu, který je vyšší než 1 % (3).

2.2.13.5.1.1.1 Výhody a nevýhody proporční metody

Proporční metoda je výhodná pro svou finanční nenáročnost. K jejím nevýhodám patří nestandardnost kultivačních půd s antituberkulotiky, postupné snižování účinnosti antituberkulotik v půdách a také dlouhá inkubace (3 týdny, případně i déle) (17).

2.2.13.5.1.2 Testování citlivosti v BACTEC® MGIT™ 960

Jedná se o stanovení citlivosti k základním antituberkulotikům v poloautomatickém systému. Princip přístroje byl již popsán výše (viz kapitola kultivace v tekutých půdách). Do zkumavek MGIT se přidává testované léčivo v dané koncentraci (Příloha 6). Přístroj porovnává růst ve zkumavkách s antituberkulotikem s růstem v kontrolních lahvičkách bez antituberkulotika. Výsledek je vyhodnocen přístrojem (Příloha 7).

2.2.13.5.1.2.1 Výhody a nevýhody testování citlivosti v BACTEC® MGIT™ 960

Největší výhodou tohoto typu vyšetření citlivosti je rychlost dosažení výsledku, vyhodnocení za 5 – 10 dní od inokulace, další výhodou je vysoká citlivost. Naopak jeho nevýhodou oproti ostatním způsobům je stránka ekonomická (17).

2.2.13.6 Nepřímá diagnostika

V laboratorní diagnostice tuberkulózy se uplatňuje i nepřímá diagnostika, tj. průkaz reakce organismu na přítomnost tuberkulózních antigenů. Používá se tzv. IGRA metoda – Interferon Gamma Release Assay. Jedná se o průkaz interferonu gama produkovaného specifickými T-lymfocyty po jejich stimulaci tuberkulózními antigeny.

V České republice mají uplatnění dvě IGRA metody:

- QuantiFERON® – TB Gold – diagnostický imunologický test k in vitro detekci přítomnosti a kvantifikaci interferonu- γ produkovaného jako odpověď na stimulaci specifickými peptidovými antigeny *Mycobacterium tuberculosis*
- T-SPOT TB- diagnostický imunologický test k in vitro detekci efektorových T-lymfocytů, které jsou senzibilizované antigeny *Mycobacterium tuberculosis*.

K dalším nepřímým diagnostickým testům patří tuberkulinový kožní test (modifikace podle Mantoux). Principem je intradermální vpich čištěného proteinového derivátu z tuberkulózních bacilů, po inkubaci se provádí odečet indurace.

2.2.14 Terapie onemocnění způsobených *Mycobacterium tuberculosis*

Terapie spadá do kompetence plicních lékařů, kteří se řídí postupy České pneumologické a fizeologické společnosti (ČPFSS). Tato společnost vytváří doporučené postupy diagnostiky a léčby tuberkulózy a dalších ostatních chorob ústrojí dýchacího (23).

V dřívějších dobách se aktivní tuberkulóza léčila klidovou nebo klimatickou léčbou v sanatoriích nebo také chirurgickými zákroky, jako jsou například opakované pneumotoraxy. Ovšem od doby, kdy se začala cíleně používat antituberkulotika, tento druh léčby téměř vymizel (3).

K terapii tuberkulózy se používají látky, které jsou původu biologického, ale také látky, které jsou připravované synteticky. Oba tyto typy látek jsou chemicky definovatelné. Při objasnění látek biologického původu, následuje jejich syntéza nebo chemická modifikace (24).

Od začátku používání antituberkulotik v klinické praxi došlo k výraznému zlepšení prognózy tuberkulózy a výraznému snížení úmrtnosti na tuto chorobu. Celková a dlouhodobá léčba těmito léky má svá rizika, a proto se ještě před zahájením léčby musí bakteriologickými i ostatními vyšetřeními diagnóza tuberkulózy potvrdit (25).

Na základě poznatků a zkušeností ze vzniku rezistencí, byly vypracované pro terapii tuberkulózy léčebné režimy. V současné době je tuberkulóza léčena kombinací několika antituberkulotik, v optimálních dávkách a ve specificky určených časových intervalech. Antituberkulotika se podávají pod dohledem, tedy kontrolovaně a dlouhodobě (3; 24).

2.2.14.1 Léčebné fáze

Terapie se dělí do dvou fází:

- iniciální (úvodní, intenzivní) fáze
- pokračující fáze.

2.2.14.1.1 *Iniciální fáze*

Na začátku léčby jde o redukci počtu mykobakterií na co nejnižší množství a zabránění selekce rezistentních mutací. Terapie v této fázi vychází z aplikace čtyřkombinace základních antituberkulotik v denní dávce a většinou za hospitalizace. Toto je tedy naplní iniciální fáze, která obvykle trvá dva měsíce (2; 3).

2.2.14.1.2 *Pokračující fáze*

V pokračovací fázi nastává podávání antituberkulotik intermitentně, jelikož je nutné zasáhnout mykobakterie ve fázi jejich intenzivního dělení a při intenzivním

metabolismu, aby bylo zabráněno množení zárodků, které přežily v lézích po předešlé terapii. Tato fáze je delší a trvá asi 6 – 8 měsíců a je tvořena dvojkombinací nebo trojkombinací antituberkulotik. Průběh léčby bývá již ambulantní a cílem je úplný sterilizační efekt (2; 3).

2.2.14.2 Antituberkulotika

Léčivé látky, které přímo působí na *Mycobacterium tuberculosis*, rozmnožující se v napadeném organismu, nazýváme antituberkulotika (24).

2.2.14.2.1 Historie antituberkulotik

V roce 1942 Domagk zavedl do léčby tuberkulózy tiosemikarbazonovou substanci (TSC), k čemuž vedlo úsilí vědců, kteří objevili tuberkulostatické vlastnosti některých sulfathiazolových vazeb.

V roce 1943 objevil Lehman tuberkulostatické vlastnosti kyseliny paraaminosalicylové (PAS).

Streptomycin (STM) byl objeven na rozhraní roku 1943 – 1944 Wachsmanem. STM bylo první významné antituberkulotikum, které zasahovalo do léčby velice těžkých forem tuberkulózy, jako např. miliární tuberkulózy, a používá se dodnes.

Dalším antibiotikem používaným k léčbě tuberkulózy byl viomycin (VM) v roce 1950.

V roce 1952 byl objeven a zaveden isoniazid (INH), čímž nastal obrat v léčbě tuberkulózy. INH měl výrazně lepší terapeutické výsledky, byl méně toxický než dříve používané preparáty a lidský organismus ho mnohem lépe toleroval. Dále byly v téže době zavedeny do léčby pyrazinamid (PZA) a cykloserin (CS).

Škálu antituberkulotik rozšířily kanamycin (KM) a ethionamid (ETH) již v letech 1954 – 1955.

Další obohacení o terapeutické možnosti nastalo v roce 1960, a to zavedením capreomycinu (CM) a po něm dále ethambutolu (EMB) v roce 1961 – 1967 a rifampicinu (RMP) v roce 1966 (24).

2.2.14.2.2 Základní antituberkulotika

- streptomycin (STM)
- isoniazid (INH)
- rifampicin (RMP)
- ethambutol (EMB)
- pyrazinamid (PZA)

V některých případech se mohou použít také jiná léčiva, jako jsou například rifabutin, capreomycin, amikacin, makrolidy nebo fluorchinolony (3).

Po dobu dvou měsíců od bakteriologického ověření onemocnění se k léčbě používá kombinace čtyř antituberkulotik, a to INH, RMP, EMB, PZA nebo kombinace INH, RMP, STM, PZA. Následná léčba pokračuje s pomocí již jen dvou antituberkulotik, a to INH a RMP nebo INH a EMB. Je nutné podávat léčbu kombinovaně, protože jinak by se zde vytvořilo velké riziko vzniku rezistentních mutací. Takovéto rezistentní mutace se projevují frekvencí přibližně jednou za 10^8 buněčných dělení (3; 25).

2.2.14.2.2.1 Streptomycin (STM)

2.2.14.2.2.1.1 Vlastnosti STM

STM je antituberkulotikum patřící do skupiny aminoglykosidů, dobře rozpustné ve vodě a stabilní.

2.2.14.2.2.1.2 Spektrum účinku STM

Je indikován při potřebě likvidace mykobakterií, dále se také používá k likvidaci grampozitivních a gramnegativních nespecifických bakterií, dále např.: brucel, *Yersinia pestis*, klebsiel aj. Vůči STM jsou rezistentní atypické mykobakterie, rickettsie, klostridia a bakteroidy.

2.2.14.2.2.1.3 Mechanismus účinku STM

Baktericidní účinek STM se projevuje na extracelulárně uložené proliferující mykobakterie, na klidové formy působí méně.

2.2.14.2.2.1.4 Cesta podání STM

Ne zcela vhodným způsobem je perorální podávání STM, jelikož se téměř vůbec neresorbuje z gastrointestinálního traktu. Stejně tak je to i u inhalování nebo u intratekálního podávání, kdy se do séra dostává jen nepatrné množství STM. Vhodným způsobem je parenterální aplikace nebo intramuskulární aplikace injekcí.

2.2.14.2.2.1.5 Farmakokinetika STM

Biologický poločas rozpadu STM je 2 – 3 hodiny. Sérová koncentrace, která má minimální terapeutický účinek, je přibližně 10 µg/ml. Při léčbě infekce způsobené *Mycobacterium tuberculosis* je minimální inhibiční koncentrace přibližně 0,1-1,0 µg/ml.

STM se v organismu eliminuje prostřednictvím glomerulární filtrace. Vylučuje se močí, už za 24 hodin se vyloučí 90 % dávky. Minimální vylučování probíhá žlučí a stolicí (cca 1 – 2 %).

2.2.14.2.2.1.6 Vedlejší nežádoucí účinky STM

STM stejně jako ostatní aminoglykosidová antibiotika vytváří v endolymfě vnitřního ucha relativně vysokou koncentraci, která prostřednictvím různých mechanismů toxicky poškozuje vnitřní membrány. Proto nesmí být překročeno dávkování STM. K poškození vnitřního ucha může také dojít následkem pomalého vylučování STM při normálním dávkování, při jeho dlouhotrvajícím podávání. Tento nežádoucí vedlejší účinek je nejvýznamnější, vztahuje se na VIII. mozkový nerv, kochleární poškození (5 – 15 % pacientů). K dalším nežádoucím účinkům patří vestibulární poruchy (až 25 % pacientů), neurotoxické projevy, nefrotoxické poškození, poškození zraku, alergické reakce.

2.2.14.2.2.1.7 Kontraindikace podání STM

Kontraindikací k užívání STM je alergie na STM, předešlé poškození VIII. mozkového nervu, anurie a těžká porucha exkretční funkce ledvin nebo porucha kardiovaskulárního aparátu. Dále se nedoporučuje jeho podávání v graviditě, a to hlavně v prvních pěti měsících. Mezi ostatní kontraindikace patří kojenecký, dětský a stařecký věk. Před začátkem terapie STM je vhodné vyšetřit sluch, ledvinové funkce, ústřední rovnováhy, ale také vyloučit graviditu. Při podezření projevení se nežádoucích účinků je nutné léčbu STM ihned přerušit (24; 25).

2.2.14.2.2.2 Isoniazid (INH)

2.2.14.2.2.2.1 Vlastnosti INH

Synteticky připravovaný hydrazid kyseliny isonikotinové, rozpustný ve vodě.

2.2.14.2.2.2.2 Spektrum účinku INH

Využívá se jeho výhradního účinku téměř pouze proti *Mycobacterium tuberculosis*, nepůsobí ani na převážnou většinu atypických mykobakterií.

2.2.14.2.2.2.3 Mechanismus účinku INH

Baktericidní účinek INH na proliferující kmeny nastává při troj až pětinasobném překročení minimální inhibiční koncentrace. Bakteriostaticky působí na mykobakterie při nižších koncentracích. INH zasahuje intracelulární i extracelulární mykobakterie. Interferuje s tvorbou buněčné stěny mykobakterie, protože nejspíše inhibuje syntézu mykolových kyselin.

2.2.14.2.2.2.4 Cesta podání INH

Vhodné podání INH je orální cestou, protože se dobře a rychle resorbuje. Nejúčinnější je aplikace INH jednorázově a nalačno, protože jeho biologické účinky se výrazně snižují po přijetí jídla. Vzácně v indikovaných případech může být INH aplikován formou infúze.

2.2.14.2.2.2.5 Farmakokinetika INH

Biologický poločas rozpadu je 1 – 3 hodiny. Minimální inhibiční koncentrace INH se pohybuje v rozmezí 0,5 – 0,1 µg/ml.

V nezměněné podobě přechází přes glomerulární filtraci v ledvinách asi 4 – 20 % INH. Zbytek se metabolizuje hlavně v játrech. 50 – 100% sérové koncentrace dosahuje INH ve tkáních a tělových tekutinách, protože se tam rychle a dobře distribuuje.

2.2.14.2.2.2.6 Vedlejší nežádoucí účinky INH

Projevení nežádoucích účinků je závislé na velikosti dávky INH. Mezi nejzávažnější vedlejší účinky patří periferní neuritida vyznačující se symetrickým ochrnutím na dolních končetinách, posléze i na rukách. Někdy se projevuje i na hrudníku formou intrakostálních neuralgií a myalgií hrudníkového svalstva. K dalším nežádoucím účinkům patří poruchy funkce CNS, křeče, hepatotoxické účinky, gastrointestinální poruchy. K méně častým nežádoucím účinkům patří astmatické záchvaty, alergie, exantémy na kůži, horečka, bolesti kloubů, bílkovina v moči, přechodná hematurie, u některých osob se může vyskytnout porucha srdečního rytmu, poruchy krvetvorby.

2.2.14.2.2.2.7 Kontraindikace podání INH

INH nelze podávat při akutní hepatidě nebo periferní neuritidě, jde se o absolutní kontraindikaci. V případě záchvatových chorob CNS a psychóz, jde o relativní kontraindikaci. Vyšší opatrnosti se dbá u starších pacientů, alkoholiků, diabetiků a epileptiků (24; 25).

2.2.14.2.2.3 Rifampicin (RMP)

2.2.14.2.2.3.1 Vlastnosti RMP

RMP pochází ze skupiny ansamycinů, s jiným antibiotikem není příbuzný, má žlutočervenou barvu. Dobře se rozpouští ve vodě, v organických rozpouštědlech a v prostředí s kyselým pH.

2.2.14.2.2.3.2 Spektrum účinku RMP

RMP je antibiotikum se širokospektrálním účinkem. Kromě účinku na *Mycobacterium tuberculosis* je známý jeho účinek na grampozitivní i gramnegativní bakteriální kmeny, ale také na některé atypické mykobakterie.

2.2.14.2.2.3.3 Mechanismus účinku RMP

Baktericidní působení na proliferativní extracelulární a intracelulární kmeny se projevuje při překročení čtyřnásobku minimální inhibiční koncentrace. Inhibuje bakteriální RNA-polymerázy.

2.2.14.2.2.3.4 Cesta podání RMP

Rychlá a téměř bezezbytková resorpce nastává při orálním podávání RMP jednu hodinu před jídlem. Dále je možné podávat lék intravenózně.

2.2.14.2.2.3.5 Farmakokinetika RMP

Biologický poločas účinnosti jedné dávky je 3 – 4 hodiny. Minimální inhibiční koncentrace RMP se pohybuje v rozmezí 0,05 – 0,5 µg/ml.

Z velké části (asi 75 – 80 %) se RMP váže na sérové bílkoviny a dále dobře difunduje do tělních tekutin i orgánů. Močí se v aktivní formě vylučuje více než 25 % léčivé látky. Převážná část se metabolizuje na antibakteriálně účinnou látku deacetylriřampicin. Více než 95 % metabolitů se vylučuje žlučí a přibližně 2 % metabolitů se vylučují močí. Eliminace RMP závisí na velikosti dávky léčiva a na funkci ledvin.

2.2.14.2.2.3.6 Vedlejší nežádoucí účinky RMP

K nejčastějším nežádoucím účinkům patří poruchy funkce jater, které se projevují zvýšenou aktivitou transamináz a bilirubinu v séru. Tyto poruchy bývají s méně intenzivním průběhem. Vyskytují se asi u 11 % nemocných. Mezi další nežádoucí vedlejší účinky patří žaludeční nevolnosti (2 % pacientů), kožní projevy (1 – 3 % pacientů). Zřídka se projeví systémové imunologické reakce a neurologické příznaky, jako např. závratě, nespavost, bolest hlavy.

2.2.14.2.2.3.7 Kontraindikace podání RMP

Vzhledem k dokázanému embryotoxickému efektu u zvířat je nejzávažnější kontraindikací užívání RMP časná gravidita. Další kontraindikací je uzavření žlučových cest, poškození jater, těžké hyperbilirubinémie, alkoholismus (24; 25).

2.2.14.2.2.4 Ethambutol (EMB)

2.2.14.2.2.4.1 Vlastnosti EMB

EMB je získávaný synteticky, jedná se o pravotočivý etylendiaminový derivát, který je stabilní a ve vodě dobře rozpustný.

2.2.14.2.2.4.2 Spektrum účinku EMB

Antibakteriální účinnost EMB se výhradně zaměřuje na mykobakterie a mnohé atypické mykobakterie.

2.2.14.2.2.4.3 Mechanismus účinku EMB

Je prokázán pouze bakteriostatický účinek EMB na proliferující kmeny nacházející se intracelulárně a extracelulárně.

2.2.14.2.2.4.4 Cesta podání EMB

Vhodným způsobem je perorální podávání, kdy se 20 % vyloučí stolicí, ale téměř 80 % EMB se rychle resorbuje. Dále pak intravenózní aplikace infuzí nebo injekčně.

2.2.14.2.2.4.5 Farmakokinetika EMB

Biologický poločas rozpadu EMB trvá okolo 4 hodin. Terapeuticky účinná sérová koncentrace je 1 – 2 µg/ml. Minimální inhibiční koncentrace se pohybuje v rozmezí 1 – 2 µg/ml.

Koncentrace EMB je 2-3x vyšší v erytrocytech než v séru, protože EMB do erytrocytů snadno difunduje a zůstává v nich relativně dlouho navázaný. EMB prochází dokonce i do mozkomíšního moku. Vylučování je pomalé, v průběhu celého dne se téměř 40-50 % EMB vylučuje ledvinami v nezměněné podobě. Formou inaktivních metabolitů se vylučuje stolicí 20 % a močí 8-15 %.

2.2.14.2.2.4.6 Vedlejší nežádoucí účinky EMB

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří poškození zřakového nervu, které se může projevit jako retrobulbární neuritida. K dalším nežádoucím projevům patří výskyt gastrointestinální poruchy, především žaludeční těžkosti. Málokdy se vyskytují závratě, bolesti hlavy, kloubů a úzkostné stavy.

2.2.14.2.2.4.7 Kontraindikace podání EMB

Nejvýznamnější kontraindikací je poškození očního nervu nebo alergie na EMB. U nemocných s ledvinovou nedostatečností se musí při dávkování dbát na mimořádnou opatrnost. Opatrnost je dále potřebná při diabetu a u alkoholiků (24; 25).

2.2.14.2.2.5 Pyrazinamid (PZA)

2.2.14.2.2.5.1 Vlastnosti PZA

Jedná se o amid kyseliny pyrazinkarbonové, je stabilní a jeho rozpustnost ve vodě je nízká.

2.2.14.2.2.5.2 Spektrum účinku PZA

PZA je antituberkulotikum, které působí specificky na *Mycobacterium tuberculosis*. Optimální pH pro jeho účinnost je 5, tedy kyselé prostředí.

2.2.14.2.2.5.3 Mechanismus účinku PZA

Jeho baktericidní účinek se projevuje při kyselém pH, při fyziologickém pH působí na mykobakterie uložené intracelulárně a extracelulárně bakteriostaticky.

2.2.14.2.2.5.4 Cesta podání PZA

PZA se podává perorálně, protože se dobře resorbuje.

2.2.14.2.2.5.5 Farmakokinetika PZA

Biologický poločas rozpadu PZA se nachází v rozmezí 10-12 hodin. Při pH 5 je minimální inhibiční koncentrace 50–100 µg/ml.

PZA relativně dobře difunduje do orgánů, serózních dutin a mozkomíšního moku. V séru se nachází v nezměněné formě téměř 60 % PZA, z toho se pak dále 40 % metabolizuje a část se vylučuje v nezměněné formě. K eliminaci nezměněné formy PZA i metabolitu dochází výhradně ledvinami.

2.2.14.2.2.5.6 Vedlejší nežádoucí účinky PZA

Jako hlavní nežádoucí vedlejší účinek se projevuje poškození jater (2–3 % pacientů). Rozsah poškození jater je přímo úměrný dávce. K dalším nežádoucím účinkům patří gastrointestinální poruchy vyznačující se nechutenstvím, žaludečními křečemi, nevolností. Dále pak poškození CNS, exantémy, hyperurikemie.

2.2.14.2.2.5.7 Kontraindikace podání PZA

Kontraindikace léčby PZA nastává u nemocných trpících akutní hepatitidou, jiným závažným poškozením jater, alergií na PZA, dnou, renální insuficiencí a také u nemocných s předešlým poškozením jater (24; 25).

2.2.14.2.3 Rezistence na antituberkulotika

Při léčbě tuberkulózy je nutné brát v úvahu možnost vytvoření rezistence na podávané antituberkulotikum. Rezistence se všeobecně rozděluje na primární a sekundární rezistence (24).

2.2.14.2.3.1 Primární rezistence

Jako primární rezistenci označujeme stav, kdy u pacienta s tuberkulózou, který ještě nikdy nebyl léčený antituberkulotiky, se vyskytuje rezistence vůči jednomu nebo více antituberkulotikům. Primární rezistence se nejčastěji pozoruje při léčbě INH, STM a PAS. Mimořádně k této situaci dochází při léčbě EMB a RMP.

Primární rezistence se v klinické praxi rozlišují na:

- bazální – přirozené rezistence
- získané primární rezistence (vzniká infikováním pacienta sekundárně rezistentními bakteriemi) (24).

2.2.14.2.3.2 Sekundární rezistence

Jsou to rezistence získané. Takto se označují rezistence vzniklé v případě, kdy se dokáže přítomnost mykobakterií rezistentních buď vůči jednomu, nebo více druhům antituberkulotik, která původně u daného pacienta byla citlivá. Může se tak stát při opakovaném nakažení tuberkulózou anebo při vzniku mutací na DNA mykobakterií během léčby. Hlavní příčinou vzniku těchto rezistencí bývá nepravdivé užívání antituberkulotik nebo nesprávný způsob terapie (24).

2.2.14.2.4 *Rezistence Mycobacterium tuberculosis*

- monorezistentní kmen: rezistence na jedno antituberkulotikum první (základní) řady
- polyrezistentní kmen: rezistence na více než jedno základní antituberkulotikum (kromě současné rezistence na INH a RIF)
- multirezistentní kmeny (multi drug resistant - MDR): rezistence na RIF a INH

- extensively drug-resistant (XDR): rezistence na INH a RIF, k tomu ještě rezistence na některé preparáty tzv. druhé řady tj. na jakýkoliv fluorochinolon a dále nejméně jedno z injeztabilních antibiotik (amikacin, kanamycin, capreomycin) (26; 27; 28).

2.2.14.2.4.1 Multidrug-resistant (MDR)

Kmeny *Mycobacterium tuberculosis*, které jsou rezistentní k rifampicinu a zároveň k isoniazidu nebo k těmto dvou antituberkulotikům současně a ještě i k některým dalším preparátům, se označují jako multirezistentní kmeny, z angličtiny multi-drug resistant. Isoniazid a rifampicin patří mezi nejdůležitější a zároveň nejúčinnější antituberkulotika. Tyto rezistentní kmeny jsou proto velmi nebezpečné. Pacient, který je tímto kmenem infikován, má horší šanci na vyléčení. Multirezistentní kmeny se do České republiky mohou dostat ze zemí s vysokým výskytem tuberkulózy např. z jihovýchodní Asie, z Afriky. Mohou se šířit mezi rizikovými skupinami, mezi imigranty, lidmi ve výkonu trestu atd. (3).

Od tuberkulózy, která byla způsobena citlivými mykobakteriemi, se onemocnění způsobené MDR neliší klinickým obrazem, ani rentgenologickým, fyzikálním a ani základním laboratorním nálezem. Takový nález, jako je určení MDR kmene, je možné získat pouze na základě pozitivní kultivace a stanovení citlivosti kmene. Toto vyšetření je proto zásadní (29).

Vznik multirezistentních kmenů neustále ohrožuje veřejné zdraví na celém světě. Podle Světové zdravotnické organizace bylo popsáno ve světě v roce 2011 asi 310 000 případů MDR. Téměř 60 % případů pocházelo z Indie, Číny a Ruska. Odhaduje se, že asi 9 % případů tvořily těžké formy rezistence XDR. Vzhledem k tomu je zapotřebí, aby se výzkum soustředil na nové léčebné sloučeniny a nové léčebné programy (30).

3 CÍL PRÁCE

- vytvoření přehledu současných metod stanovení citlivosti *Mycobacterium tuberculosis* k základním antituberkulotikům
- porovnání dvou metod stanovení citlivosti k základním antituberkulotikům na základě vyšetření souboru izolátů *Mycobacterium tuberculosis* na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň v Laboratoři pro diagnostiku mykobakterií
- zhodnocení získaných výsledků z hlediska demografického, diagnostického a epidemiologického

4 METODIKA

4.1 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÉHO SOUBORU

Ve své bakalářské práci jsem sledovala soubor 275 izolátů *Mycobacterium tuberculosis* získaných ze vzorků klinického materiálu od pacientů z lůžkových i z ambulantních zařízení. Jednalo se vždy o první kultivačně pozitivní vzorek u každého pacienta. Vzorky materiálu byly dodány ke zpracování v období leden 2008 až červen 2013. Byly zpracovány v Ústavu mikrobiologie FN v Plzni v Laboratoři pro diagnostiku mykobakterií standardním způsobem: dekontaminace metodou s N-acetyl-L-cysteinem, mikroskopické vyšetření fluorescenčním barvením, kultivace v tekutém kultivačním médiu Midlebrook 7H12B v poloautomatickém systému BACTEC[®] MGIT[™] 960 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) a na pevných vaječných kultivačních půdách - Löwenstein-Jensen a Ogawa (TRIOS, Olomouc, Česká republika).

Po nárůstu na kultivačních půdách byla provedena identifikace kmenů metodou genové sondy pro *Mycobacterium tuberculosis* komplex (GenProbe, San Diego, CA, USA) a dále pomocí biochemických testů produkce niacinu, redukce nitrátů a testu citlivosti na TCH - hydrazid kyseliny thiofen-2-karbonové (TRIOS, Olomouc, Česká republika).

Poté byla u všech kmenů stanovena citlivost k základním antituberkulotikům (streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamid) metodou proporční dle Canettiho a metodou v uzavřeném systému BACTEC[®] MGIT[™] 960 podle standardních operačních postupů (SOPV) pracoviště a podle doporučených postupů výrobce.

4.2 POUŽITÉ METODY TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

- doporučená metoda dle Canettiho
- testování citlivosti v uzavřeném systému BACTEC[®] MGIT[™] 960

4.2.1 Pomůcky- doporučená metoda podle Canettiho

4.2.1.1 Přístrojové vybavení

- třepačka THERMOLYNE 65800
- denzitometr DENSI - 2
- komorový termostat – regulátor vlhkosti: klima ADCD 000110

4.2.1.2 Technické pomůcky

- sterilní lahvičky (odběrová nádoba pro sputum)
- zkumavky vhodné k měření v denzitometru (GAMA GROUP a.s.)
- mikropipety Pipet – Lite XLS a špičky s filtrem (RAININ-METTLER TOLEDO Company, Greifensee, Switzerland)
- plastové pipety Pasteur (Biosigma)
- sterilní plastové inokulační kličky (FL Medical, Torreglia, Italy)
- stojánky na zkumavky
- sterilní skleněné perličky

4.2.1.3 Chemické pomůcky

- sterilní destilovaná voda (Ardeapharma a.s., Ševětín, ČR)
- vaječné půdy obsahující antituberkulotika (TRIOS, Olomouc, Česká republika)
- vaječné půdy Löwenstein-Jensen bez antituberkulotika (TRIOS, Olomouc, Česká republika)

4.2.1.3.1 Použité kultivační půdy Löwenstein-Jensen (LJ) s obsahem léčiv (mg/l)

- LJSTM LJ + STM 6,0
- LJSTM LJ + STM 10,0
- LJINH LJ + INH 0,2
- LJINH LJ + INH 1,0
- LJRIF LJ + RIF 5,0
- LJE LJ + EMB 2,0
- LJPZ LJ + PZA 400
- LJPZO LJ + PZA kontrola bez antituberkulotika

4.2.2 Pomůcky - testování citlivosti v uzavřeném systému BACTEC[®] MGIT[™] 960

4.2.2.1 Přístrojové vybavení

- třepačka THERMOLYNE 65800
- denzitometr DENSI – 2
- BACTEC[®] MGIT[™] 960

4.2.2.2 Technické pomůcky

- sterilní lahvičky (odběrová nádobka na sputum)
- zkumavky vhodné k měření v denzitometru (GAMA GROUP a.s., České Budějovice, ČR)
- mikropipety Pipet a špičky s filtrem (RAININ-METTLER TOLEDO Company, Greifensee, Switzerland)
- plastové pipety Pasteur (Biosigma, Cona, ITALY)
- sterilní plastové inokulační kličky (FL Medical, Torreglia, Italy)
- stojánky na zkumavky
- sterilní skleněné perličky

4.2.2.3 Chemické pomůcky

- sterilní destilovaná voda (Ardeapharma a.s., Ševětín, ČR)

4.2.2.4 Komerční vybavení k metodě (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)

- zkumavky MGIT
- zkumavky PZA MGIT
- suplementy
- naředěná antituberkulóza
- pracovní soupravy (koncentrace antituberkulotik po rekonstituci):

- BD BACTEC[®] MGIT[™] 960 SIRE Kit: SIRE suplement
83 µg streptomycin (S)
8,3 µg isoniazid (I)
83µg rifampicin (R)
415 µg ethambutol (E)
- BD BACTEC[®] MGIT[™] 960 PZA Kit: PZA suplement
8000 µg pyrazinamid

4.2.2.4.1 Příprava ředění antituberkulotik

K lyofylizovaným antituberkulotikům (S, I, R, E), dodaným v setu BD BACTEC[®] MGIT[™] 960 SIRE Kit byly mikropipetou přidány 4 ml sterilní destilované vody. K lyofylizovanému PZA, dodanému v setu BD BACTEC[®] MGIT[™] 960 PZA Kit, bylo mikropipetou přidáno 2,5 ml sterilní destilované vody. Po úplném rozpuštění lyofylizátu byly roztoky rozděleny (po 0,33 ml) do zkumavek typu Eppendorf a zamraženy. Před každým provedením testování citlivosti bylo čerstvě rozmrazeno potřebné množství antituberkulotik.

4.2.3 Shodná část metodického postupu pro obě použité metody

4.2.3.1 Příprava pomůcek

Před zahájením samotného zpracování testů citlivosti byly vysterilizovány skleněné perličky v horkovzdušném sterilizátoru. Sterilizace byla provedena při 100 °C po dobu 15 minut. Skleněné perličky byly po dobu sterilizace uloženy ve skleněné otevřené laboratorní nádobě. Další součástí přípravy bylo důkladné vyčištění, dezinfekce a vysvícení biohazardního boxu UV světlem (minimální doba záření byla 30 minut). Dále

pak příprava a řádný identifikační popis všech používaných sterilních lahvíček, denzitometrických zkumavek, kontrolních a testovacích pevných půd (platí pro proporční metodu) a zkumavek MGIT (platí pro testování citlivosti v BACTEC® MGIT™ 960).

4.2.3.2 Zpracování izolátů

K testování citlivosti oběma metodami byly použity čerstvě narostlé izoláty *Mycobacterium tuberculosis* ve zkumavce pro detekční systém BACTEC® MGIT™ 960 s tekutým kultivačním médiem nebo na pevné kultivační vaječné půdě Löwenstein-Jensen či Ogawa.

4.2.3.2.1 Zpracování izolátu ze zkumavky BACTEC® MGIT™ 960

Do připravené a popsané sterilní lahvičky byly přidány k rysce 5 ml vysterilizované skleněné perličky a 1,5 ml narostlé kultury ze zkumavky BACTEC® MGIT™ 960. Obsah sterilní lahvičky byl následně razantně ručně protřepán a poté byla lahvička vložena ve stojánek do třepačky, kde se její obsah nechal třepat po dobu 20 minut. Třepání vzorku bylo nutné k rozdělení shluků narostlé kultury, tedy k důkladné homogenizaci.

4.2.3.2.2 Zpracování izolátu z pevné vaječné půdy

Do připravené a popsané sterilní lahvičky byly přidány k rysce 5 ml vysterilizované skleněné perličky a 1,5 ml sterilní destilované vody. Do takto připravené sterilní lahvičky pak byly sterilní kličkou přeneseny narostlé kolonie z pevných kultivačních

půd (1-2 plné kličky). Obsah lahvičky byl stejným způsobem jako u zpracování kmene z MGIT zkumavky ručně protřepán a pak vložen do třepačky na 20 minut.

4.2.3.3 Část postupu ředění společný pro obě metody

Po důkladné homogenizaci testovaného kmene byla do lahvičky přidána sterilní destilovaná voda (cca 4,5 ml), následně byla lahvička opět ručně protřepána. Celý obsah lahvičky byl pipetou přenesen do zkumavky pro denzitometr (pomocná ředící zkumavka). Tato zkumavka byla důkladně očištěna a vložena do denzitometru ke zjištění hodnoty zákalu. Požadovaný zákal první zkumavky na ředění byl 0,3 dle McFarlanda. Při zjištění vyšší hodnoty zákalu, bylo nutné suspenzi naředit sterilní destilovanou vodou. První zkumavka k ředění se zákalem 0,3 dle McFarlanda byla označena jako -1 (10^{-1} = zákal 0,3 McFarlanda).

4.2.3.4 Postup ředění, inokulace, inkubace a vyhodnocení proporční metody dle Canettiho

Ředění suspenze kmene se provádělo pomocí 4 denzitometrických zkumavek. První zkumavka byla tzv. pomocná a obsahovala homogenizovanou směs ze sterilní lahvičky, další 3 zkumavky potom obsahovaly ředění 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

Z denzitometrické zkumavky s označením -1, která obsahovala suspenzi o zákalu 0,3 dle McFarlanda, bylo po důkladném protřepání a opakovaném nasátí do pipety přeneseno 0,5 ml do další zkumavky s označením -2, která již obsahovala 4,5 ml sterilní destilované vody, po důkladném promíchání bylo následně pipetou přeneseno opět 0,5 ml suspenze do poslední denzitometrické zkumavky s označením -3, která také obsahovala 4,5 ml sterilní destilované vody.

Takto připravené suspenze pak byly použity k vlastní inokulaci. Nejprve se provedlo očkování tří kontrolních vaječných půd Löwenstein-Jensen (půdy bez antituberkulotika). Půdy byly označeny: K-1, K-2, K-3. Na kontrolní půdu s označením K-1 (ředění 10^{-1}) bylo pipetou naočkováno 5 kapek (cca 200 μ l) připravené suspenze z denzitometrické zkumavky s označením -1. Na kontrolní půdu s označením K-2 (ředění 10^{-2}) bylo pipetou naočkováno také 5 kapek (cca 200 μ l) připravené suspenze z denzitometrické zkumavky s označením -2. Stejným způsobem byla provedena inokulace třetí kontrolní půdy K-3 (ředění 10^{-3}). Poté bylo zahájeno očkování pevných půd s antituberkulotiky, na každou půdu bylo pipetou naneseo 5 kapek (cca 200 μ l) připravené suspenze z denzitometrické zkumavky s označením -2 (ředění 10^{-2}).

Po naočkování byla suspenze po povrchu média řádně a rovnoměrně rozprostřena a půdy byly uloženy do stojanu. Prvních 24 hodin byly půdy inkubovány ve vodorovné poloze, aby došlo ke správnému přilnutí mykobakterií k povrchu kultivační půdy. Následná inkubace probíhala již v poloze vertikální, v komorovém termostatu při 37 °C, po dobu 3 týdnů.

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno po nárůstu kultury na kontrolních půdách – počítatelné kolonie – CFU (colony forming units). Byl porovnán počet kolonií na půdách s antituberkulotiky s růstem na kontrolních půdách bez antituberkulotika. Výpočet procenta rezistentních mykobakterií byl proveden podle vzorce:

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

x% = kritická proporce

a = počet kolonií vyrostlých na půdě s kritickou koncentrací léku

b = počet kolonií vyrostlých ve stejném ředění na kontrolní půdě (ředění 10^{-2})

Vyhodnocení: kritická proporce rezistentních zárodků je 1%. Při výsledku x% menším než 1 nebo rovném 1 byl kmen vyhodnocený jako „citlivý“. Při výsledku x% větším než 1 byl kmen vyhodnocen jako „rezistentní“.

4.2.3.5 Postup ředění, inokulace, inkubace a vyhodnocení testování citlivosti v uzavřeném systému BACTEC® MGIT™ 960

Ředění se provádělo pomocí 4 denzitometrických zkumavek. První zkumavka byla tzv. pomocná a obsahovala homogenizovanou směs ze sterilní lahvičky, další 3 zkumavky potom obsahovaly ředění 10^{-1} , 10^{-2} a 10^{-3} .

Z denzitometrické zkumavky s označením -1, která obsahovala suspenzi o zákalu 0,3 dle McFarlanda, bylo po důkladném protřepání a opakovaném nasátí do pipety přeneseno 0,5 ml do druhé zkumavky s označením -2, která již obsahovala 4,5 ml sterilní destilované vody, stejným způsobem byla připravena i poslední zkumavka s označením -3.

Takto připravené suspenze byly následně použity k vlastní inokulaci. Nejprve byly naočkované kontrolní zkumavky MGIT a PZA MGIT, které již obsahovaly speciální suplement (800 μ l). Inokulace se prováděla suspenzí z denzitometrické zkumavky s označením -3 (10^{-3}) do kontrolních zkumavek pro STM, INH, RIF a EMB, do kontrolní zkumavky pro PZA pak ze zkumavky s označením -2 (ředění 10^{-2}). Bylo pipetováno 500 μ l řádně promíchané suspenze. Následně byla provedena inokulace ostatních zkumavek MGIT a PZA MGIT, které již obsahovaly speciální suplement (800 μ l) a příslušné testované antituberkulotikum (100 μ l). Inokulace byla provedena suspenzí z denzitometrické zkumavky s označením -1, která obsahovala ředění 10^{-1} . Bylo pipetováno také 500 μ l promíchané suspenze. Finální koncentrace antituberkulotik v jednotlivých lahvičkách byla v μ g/ml pro: STM 1,0, INH 0,1, RIF 1,0, EMB 5,0 a PZA 100,0.

Ihned po naočkování byly všechny zkumavky důkladně promíchány a vloženy do nosičů, které byly umístěny do přístroje BACTEC® MGIT™ 960. Kultivace v tomto poloautomatickém systému trvala 5 – 7 dní.

Po dosažení dostatečného nárůstu v kontrolní zkumavce přístroj ohlásil ukončení procesu a vyhodnotil testovanou citlivost na základě nárůstu či inhibice testovaného kmene za přítomnosti testovaného antituberkulotika.

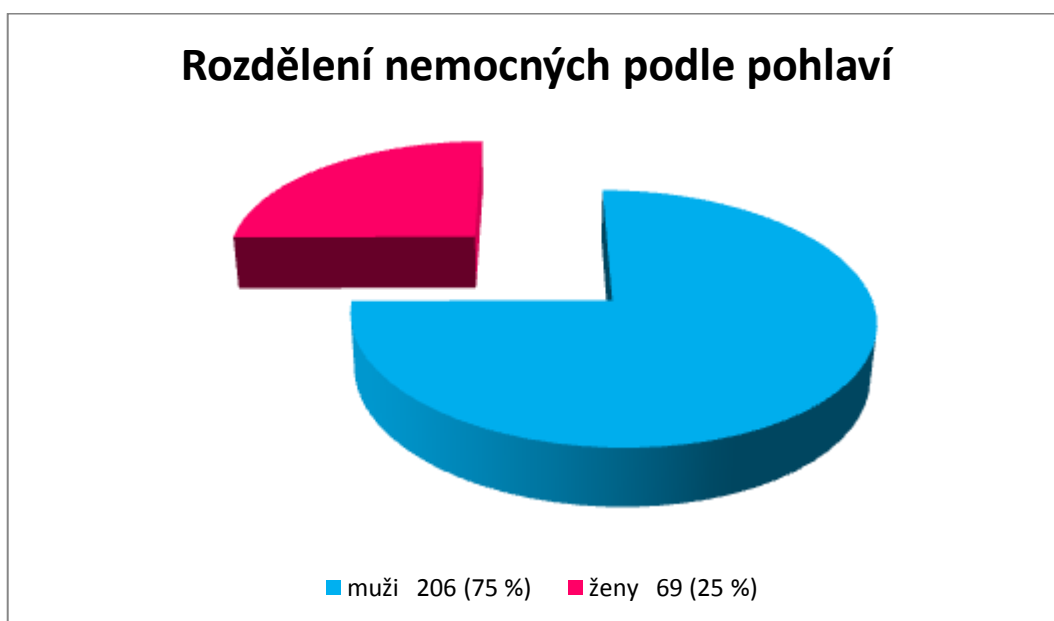
Hodnocení typu rezistence bylo provedeno podle definice MDR a XDR uveřejněné CDC – Centers for Disease Control and Prevention - Division of Tuberculosis Elimination (DTBE), Atlanta, US (26), uveřejněné v dokumentu Světové zdravotnické organizace z roku 2006 (27).

5 VÝSLEDKY

5.1 DEMOGRAFICKÉ ÚDAJE

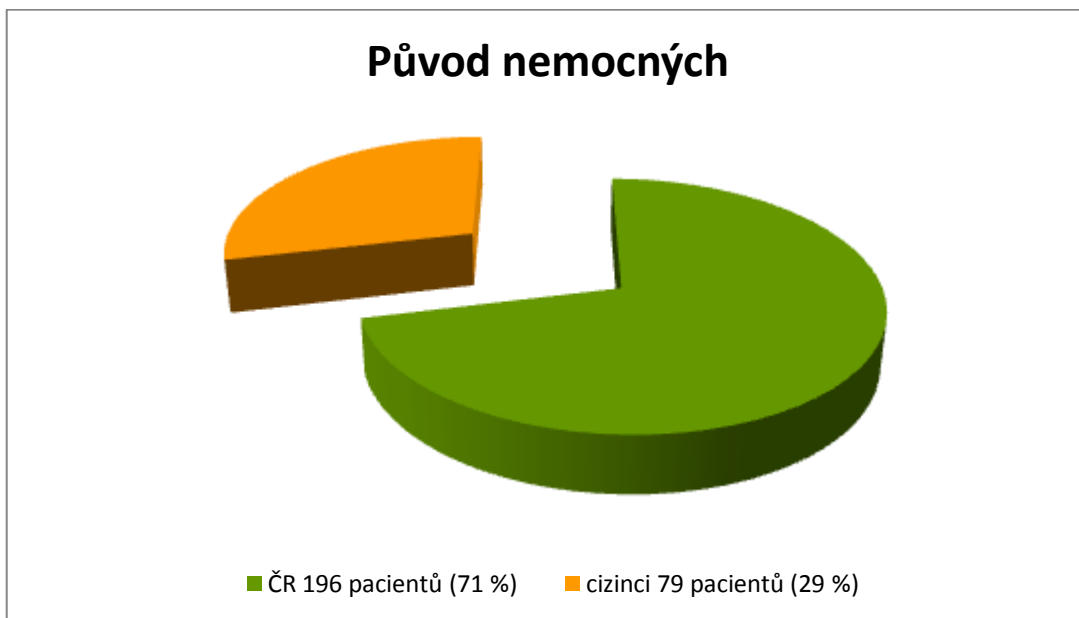
Soubor 275 izolátů *Mycobacterium tuberculosis* z klinického materiálu byl vyhodnocen z hlediska demografických údajů.

Zastoupení pohlaví - v souboru byly izolovány kmeny v 75 % od mužů a ve 25 % od žen (Graf 1).

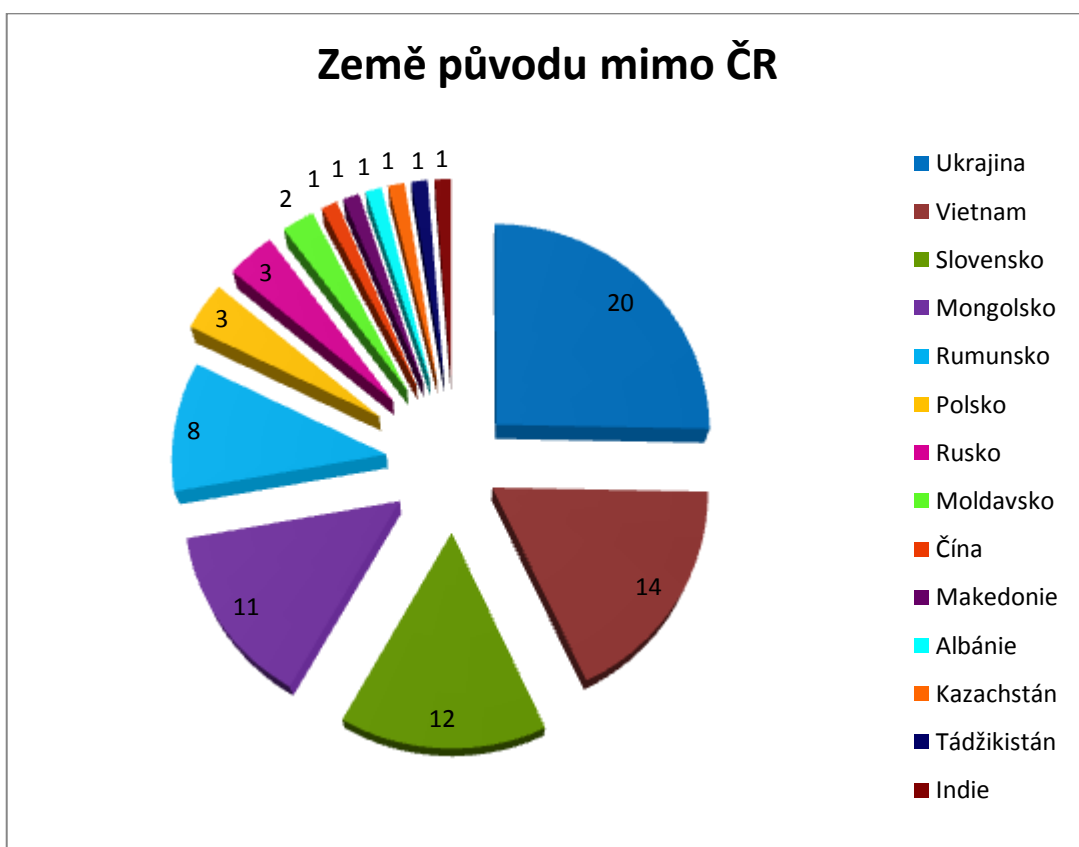


Graf 1: Rozdělení nemocných podle pohlaví

Byl sledován i původ pacientů z hlediska geografického. 196 (71 %) pacientů bylo z České republiky, pacientů pocházejících z cizích zemí bylo 79 (29 %). Přehled je znázorněn v grafech (Graf 2, str. 63; Graf 3, str. 63).

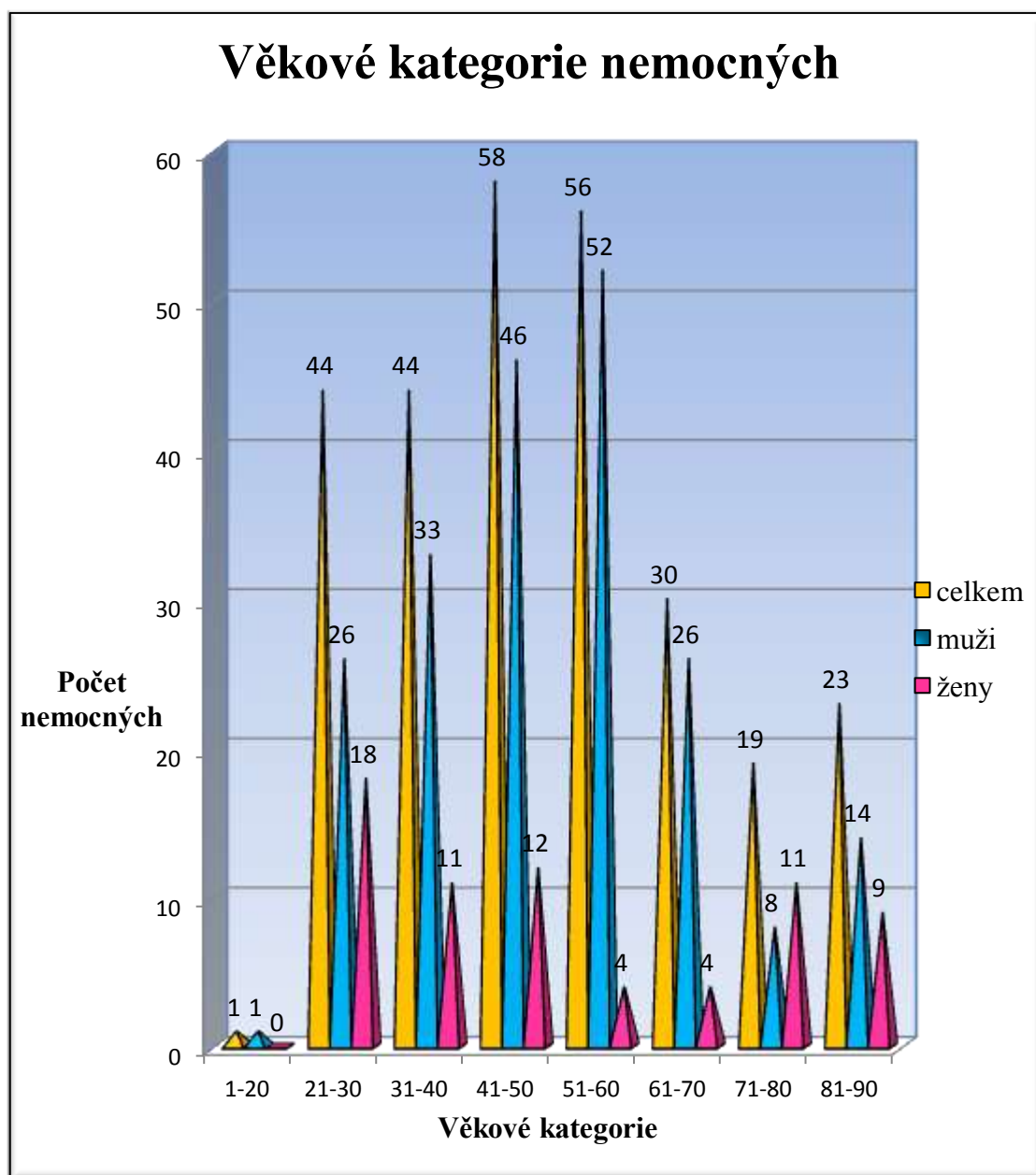


Graf 2: Původ nemocných



Graf 3: Země původu mimo ČR

Věkové rozložení pacientů je uvedeno v přehledu věkových kategorií nemocných (Graf 4). Z přehledu je zřejmé, že největší výskyt tuberkulózy byl potvrzen ve věkových skupinách 41-50 a 51-60 let.



Graf 4: Věkové kategorie nemocných

5.2 PŮVOD VZORKŮ KLINICKÉHO MATERIÁLU

Do souboru byli zařazeni pacienti z různých zdravotnických zařízení. Přehled podle typu zařízení je uveden v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1: Počet vzorků podle původu dle typu zdravotnického zařízení a věkových skupin

	ZDRAVOTNICKÉ ZAŘÍZENÍ PODLE TYPU					
věkové kategorie	A	B	C	D	E	F
1-20	0	0	1	0	0	0
21-30	0	2	22	3	16	1
31-40	2	4	23	7	8	0
41-50	2	1	30	16	7	2
51-60	1	5	26	9	13	2
61-70	0	2	14	5	8	1
71-80	0	2	11	3	2	1
81-90	1	2	12	3	5	0
celkem	6	18	139	46	59	7
celkový počet vzorků	275					

Vysvětlivky: A= ambulantní zařízení kromě odbornosti Tuberkulóza a respirační nemoci (TRN); B= lůžkové zařízení kromě TRN; C= léčebna TRN; D= lůžkové zařízení TRN; E= ambulantní zařízení TRN; F= oddělení patologie

5.3 DRUH MATERIÁLU

V souboru byl sledován také druh klinického materiálu, ze kterého byly kmeny *Mycobacterium tuberculosis* izolovány. Nejvíce izolátů bylo získáno z neinvazivně odebraného materiálu z dolních cest dýchacích tj. ze sputa. Přehled všech pozitivních materiálů uvádí tabulka (Tab. 2, str. 66).

Tab. 2: Druh materiálu

DRUH MATERIÁLU	POČET VZORKŮ
Sputum	224
BAL	20
Výpotek - hrudní	8
Tkáň – plíce	8
Výtěr z laryngu	6
Výtěr z rány	3
Absces - hnis	2
Žaludeční obsah	1
Mozkomíšni mok	1
Aspirát bronchiální	1
Ascites	1
Celkový počet vzorků	275

5.4 VÝSLEDKY STANOVENÍ CITLIVOSTI

U všech izolátů *Mycobacterium tuberculosis* byly provedeny testy citlivosti k základním antituberkulotikům dvěma metodami – porovnávací dle Canettiho a v poloautomatickém systému. U všech izolátů byla zaznamenána 100% shoda ve výsledcích z obou metod u všech testovaných léků. Rozdíl byl zaznamenán v čase dosažení výsledků (od zahájení testů citlivosti do odečtu výsledků). U porovnávací metody

byl průměrný čas trvání testu 21 dní, u metody v poloautomatickém systému to bylo průměrně 6 dní.

Vzhledem k 100% shodě v obou metodách jsou v tabulce uvedeny souhrnné výsledky (Tab. 3). Tyto výsledky jsou uvedeny ve formě profilů rezistence získaných u izolátů a počet jejich výskytu v souboru. V případě výskytu rezistence na kterýkoliv z léků je uveden i typ rezistence.

Tab. 3: *Výsledky stanovení citlivosti*

Profil rezistence č.	STM	INH	RMP	EMB	PZA	Typ rezistence	Počet vzorků
1	C	C	C	C	C	-----	251
2	R	C	C	C	C	MONO	4
3	C	R	C	C	C	MONO	4
4	C	C	R	C	C	MONO	1
5	C	C	C	C	R	MONO	3
6	R	R	C	C	C	POLY	3
7	C	R	R	C	C	MDR	2
8	C	R	R	R	C	MDR	1
9	R	R	R	R	C	MDR	2
10	R	R	R	C	R	MDR	2
11	R	R	R	R	R	MDR	2

Vysvětlivky: C= citlivý; R= rezistentní; MONO= rezistence pouze na jeden druh antituberkulotika; POLY= rezistence na více druhů antituberkulotik kromě společné rezistence k INH a RIF; MDR (multidrug-resistant)= rezistence na INH a RMP současně a případně na kterýkoliv z dalších léků

6 DISKUSE

Stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám, v našem případě k antituberkulotikům, se jako téma odborných studií objevuje ve vědecké literatuře poměrně často. Důvodem je stále větší rozšíření rezistentních kmenů u bakterií obecně, a tím ohrožení lidské populace infekčními nemocemi, které nereagují na antibiotickou léčbu tak jako dříve. I v případě léčby onemocnění tuberkulózou je třeba počítat s jistou pravděpodobností možnosti, že by se mohlo jednat o více či méně rezistentní kmen. Tato pravděpodobnost stoupá s místem původu pacienta, v zemích s vysokým výskytem tuberkulózy je i mnohem vyšší pravděpodobnost nákazy takovým rezistentním kmenem. Většina diagnostikovaných případů tuberkulózy na celém světě v roce 2012 pocházela podle Světové zdravotnické organizace z jihovýchodní Asie (29 %), Afriky (27 %) a regionů západního Tichomoří (19 %) (31).

Cílem mikrobiologického vyšetření klinického vzorku je tedy izolace patogenního kmene a vyšetření jeho citlivosti k antituberkulotikům metodou spolehlivou, rychlou a ekonomicky dostupnou. V České republice je výskyt tuberkulózy nízký, stejně tak i výskyt rezistentních kmenů je zde relativně malý (10). Tento fakt potvrdily i výsledky této bakalářské práce - za celé sledované období (leden 2008 až červen 2013) bylo získáno jen 275 izolátů *Mycobacterium tuberculosis* (v laboratoři, která vyšetřuje vzorky pro celý západočeský region ČR). Z důvodu nízkého počtu pozitivních nálezů je vyšetřování citlivosti k mykobakteriím centralizováno v ČR do omezeného počtu laboratoří. Jde o vysoce specializovanou metodu a k jejímu provedení a interpretaci je potřeba zkušeností a dostatečného počtu provedených vyšetření.

I tato práce se věnovala souboru tuberkulózních pacientů, jejich charakteristice a metodám stanovení citlivosti.

Výsledky potvrzují fakt uváděný ve statistických přehledech, že se tuberkulóza vyskytuje více u mužů než žen (10). Pro tento fakt zatím neexistují přesvědčivá vysvětlení. Podle posledních výzkumů se zde pravděpodobně uplatňuje společně řada sociálních a biologických faktorů (32; 33). V tomto souboru byl poměr mužů a žen 3:1.

Na vzniku aktivního onemocnění tuberkulózou se podílí i faktor věku pacienta. Ve sledovaném souboru bylo nejvíce nemocných ve střední věkové kategorii (40 – 60 let). To odpovídá uváděnému výskytu věkového rozložení nemocných pro Evropu v souvislosti s faktem, že rozložení podle věkových skupin závisí také i na geografické lokalitě (34). Původ nemocných se odráží na věkovém rozložení onemocnění – např. vyrovnaný výskyt v mladším, středním i starším věku (20-70 let) na Novém Zélandě (35).

Dalším zájmem bylo zhodnocení nemocných podle země původu. Z České republiky pocházelo 196 nemocných (71 %). Cizinců bylo 79 (29 %), nejvíce byli zastoupení občané Ukrajiny, Vietnamu a Slovenska. V souboru se ale vyskytly i další země z rizikových oblastí stran tuberkulózy jako např. Mongolsko nebo Rumunsko. Vysvětlení je možné hledat ve velké migraci těchto lidí do České republiky a zejména západočeského regionu kvůli pracovním příležitostem v průmyslu. Od konce 90. let v Plzeňském kraji vzniklo velké množství pracovních míst v nových průmyslových zónách, kde našli právě tyto osoby uplatnění díky pracovním agenturám. Výskyt cizinců s aktivní tuberkulózou je v tomto regionu vyšší než v rámci celé ČR (10).

Posouzení souboru z hlediska druhu vyšetřovaného materiálu je zcela ve shodě s faktem, že nejčastější lokalizace tuberkulózního procesu je plicní (1), nejvíce vyšetřovaného materiálu ze souboru je tedy z dýchacích cest (91 %), a to především sputum (81 %). Sputum je nejvhodnější materiál pro mykobakteriologické vyšetření (3; 17). Ojedinele byly vyšetřeny vzorky i z jiných lokalizací (mozkomíšni mok, ascites, výtěr z rány), protože tuberkulóza může napadnout vzácně i jiný orgán než plíce.

Spektrum zdravotnických zařízení, ze kterých byly klinické vzorky k vyšetření zaslány, potvrzuje fakt, že léčba tuberkulózy a její epidemiologická surveillance je soustředěna do ordinací a lůžkových zařízení lékařské odbornosti Tuberkulóza a respiračních nemocí. Nejvíce materiálu bylo zasláno z Léčebny tuberkulózy a respiračních nemocí Janov, což potvrzuje správné postupy lékařů, kteří usilují o to, aby byli nemocní s podezřením na tuberkulózu co nejdříve izolováni.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo porovnání dvou metod stanovení citlivosti k antituberkulotikům, které se provádějí na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň

v Laboratoři pro diagnostiku mykobakterií. Vyšetřovaný soubor 275 klinických vzorků byl současně otestován proporční metodou dle Canettiho a metodou v poloautomatickém uzavřeném systému BACTEC® MGIT™ 960. Výsledky stanovené citlivosti byly u jednotlivých izolátů v obou metodách naprosto shodné. Porovnání těchto dvou metod je předmětem i mnoha dalších studií, výsledky se víceméně shodují. Ve studii univerzitních profesorů a lékařů z Taiwanu byla prokázána shoda těchto dvou metod téměř na 100 %. Došli k závěru, že rozdíl ve výsledku mezi těmito metodami není významný. Výsledky testů lékové citlivosti jsou spolehlivé s ohledem ke zjištěné rezistenci a citlivosti (36). Tortoli et al., ve studii sledování citlivosti izolátů *Mycobacterium tuberculosis* včetně multirezistentních variant stanovil senzitivitu testu v BACTEC® MGIT™ 960 na 96,6 až 99,2 % pro jednotlivá základní antituberkulotika (STM, INH, EMB a RIF) při porovnání výsledků s metodou v radiometrickém systému Bactec 460 a metodou proporční (37). V práci sledující kvalitu laboratoří v USA v letech 1994 až 2008 v testování citlivosti referenčních kmenů byla zjištěna shoda ve výsledcích u citlivých kmenů v 97 % v obou metodách (proporční agarová a Bactec MGIT 960), u rezistentních kmenů v 91,3 % v proporční metodě a v 82,3 % v Bactec MGIT 960 (tato metoda se začala používat až v roce 2003) (38).

Většina publikovaných studií se shoduje na stanovení výhod těchto dvou metod. Výhodou metody v poloautomatickém uzavřeném systému BACTEC® MGIT™ 960 je jednoznačně podstatně kratší doba získání výsledku bez ovlivnění diagnostické přesnosti, a tím možnost rychlejšího zahájení léčby. Výhodou metody proporční je zase mnohem menší ekonomická zátěž, což v určitých situacích a podmínkách může být rozhodující (36; 37; 38). Přesné a rychlé detekce rezistence jsou klíčovou prioritou v rámci programů pro snižování nákazy tuberkulózou, pro umožnění zahájení příslušné, cílené léčby a pro podporu dohledu a monitorování rezistence citlivosti na antituberkulotika (36).

Ve vyšetřovaném souboru bylo prokázáno 24 rezistentních izolátů s různým stupněm rezistence, což představuje 8,7 %, z toho 9 izolátů (tj. 3,3 %) z celkového počtu izolátů kmenů MDR Potvrdilo se, že v porovnání se zeměmi s vysokým výskytem tuberkulózy je v České republice výskyt rezistentních kmenů velmi nízký (10). Podle

Matteelliho se ve světovém měřítku kmenů MDR vyskytuje cca 4 % u pacientů bez předchozí antituberkulotické léčby a více než 20 % u pacientů, kteří již v minulosti léčeni byli. Do konce roku 2012 zaznamenalo 92 zemí výskyt alespoň jednoho kmene s rezistencí XDR. Mezi všemi multirezistentními kmeny je v průměru 9,6 % kmenů XDR (nejvíce v zemích bývalého Sovětského svazu) (28). První XDR izolát byl objeven v roce 2001 (39). Nižší výskyt rezistentních kmenů v ČR můžeme vysvětlit jednak nižším výskytem tuberkulózy a také vysokou úrovní surveillance, epidemiologického dohledu, léčby a péče o nemocné.

7 ZÁVĚR

Na území České republiky je již po řadu let zaznamenáván klesající trend incidence tuberkulózy, nicméně v celosvětovém měřítku představuje onemocnění tuberkulózou neustále velký problém. Podle Světové zdravotnické organizace v roce 2012 na celém světě onemocnělo 8,6 milionů lidí a 1,3 milionu populace na toto onemocnění zemřelo.

V souladu s poznatky a výsledky jiných studií tato práce ukázala zásadní význam faktu, že základem laboratorní diagnostiky tuberkulózy je a musí stále být kultivační vyšetření, protože jedině tak je možné tuberkulózu jednoznačně prokázat a získat izolát původce nemoci k identifikaci a ke stanovení citlivosti k antituberkulotikům. Pouze na tomto základě může být pak pacient adekvátně léčen a může tak být sníženo epidemiologické riziko výskytu a šíření nemoci.

Hlavním předmětem této práce bylo porovnání dvou metod stanovení citlivosti k antituberkulotikům (proporční metoda dle Canettiho a testování citlivosti v uzavřeném systému Bactec MGIT 960). U vyšetření citlivosti k antituberkulotikům oběma těmito metodami byla u všech vzorků zjištěna naprostá shoda obou metod. Potvrdilo se, že z hlediska časové dostupnosti výsledků, je podstatně výhodnější metoda pomocí Bactec MGIT 960, tato metoda je ovšem ekonomicky náročná. V ekonomicky méně vyspělých a rozvojových zemích se proto více uplatňuje většinou metoda proporční. Dále se potvrdil celorepublikový trend vyššího zastoupení mužů a z hlediska věku střední věkové kategorie osob mezi nemocnými tuberkulózou.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BENEŠ, J. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-807-2626-441.
2. NETVAL, M. *Mimoplicní tuberkulóza: hlavní lokalizace*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0654-7.
3. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.
4. KOS, S. *Tuberkulóza dýchacího ústrojí*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1987.
5. KŘEPELA, K. *Tuberkulóza dětí a dorostu a její diferenciální diagnostika*. Praha: MAXDORF-JESSENIUS, 1995. ISBN 80-859-1203-1.
6. GRIFFITH, D. E., T. AKSAMIT, B. A. BROWN-ELLIOTT, A. CATANZARO, CH. DALEY, F. GORDIN, S. M. HOLLAND, R. HORSBURGH, G. HUITT, M. F. IADEMARCO, M. ISEMAN, K. OLIVIER, S. RUOSS, C. F. VON REYN, R. J. WALLACE a K. WINTHROP. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2007-02-15, vol. 175, issue 4, s. 367-416 [cit. 2014-04-27]. DOI: 10.1164/rccm.200604-571ST. Dostupné z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200604-571ST>
7. ROŽÁNEK, P. a V. MOLNÁR. *Tuberkulóza a mykobakteriózy dnes*. Praha: Karolinum, 1994.

8. BULISOVÁ, J. *Ottova encyklopedie A-Ž*. Praha: Ottovo nakladatelství, 2010. ISBN 80-736-0014-3.
9. POKORNÝ, A., Z. MERTA a F. SALAJKA. *Tuberkulóza*. Brno: Masarykova univerzita, 1998. ISBN 80-210-1851-8.
10. TRNKA, L. Tuberkulóza a respirační nemoci 2012. In: *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. 2014 [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2012>
11. PRÍKAZSKÝ, V. a M. HAVELKOVÁ. Informační systém bacilární tuberkulózy - poznatky za posledních 5 let. In: *Konference o mikrobiologii a epidemiologii tuberkulózy a nespecifických plicních infekcí: 16.10.-18.10.2002 Hradec Králové : [sborník přednášek]*. Hradec Králové: HK Credit, 2002, s. 5. ISBN 80-902-7537-0.
12. Registr tuberkulózy. *Koordináční středisko pro resortní zdravotnické informační systémy*. [online]. 2014 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: www.ksrzis.cz/dokumenty/registr-tuberkulozy-rtbc_43_114_1.html
13. Registr tuberkulózy. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR*. [online]. 2014 [cit. 2014-04-08]. Dostupné z: www.uzis.cz/registry/organu-ochrany-verejneho-zdravi/registr-tuberkulozy
14. Seznam států TBC. *Ministerstvo zdravotnictví ČR*. [online]. 2014 [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: www.mzcr.cz/Verejne/obsah/seznam-statu-s-vyssim-vyskytem-tbc_2465_5.html
15. Global Tuberculosis Report 2012. *WHO*. [online]. 2014 [cit. 2014-04-06]. Dostupné z: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_main.pdf

16. HOŘEJŠÍ, V. a J. BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 2. vyd. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4215-X.
17. KOLEKTIV AUTORŮ. *Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí*. Praha: NRL pro mykobakterie, 1998.
18. VOTAVA, V. a J. HOMOLKA. *Tuberkulóza: skripta pro posl. I. lékařské fak.* Praha: Karolinum, 1991. ISBN 80-706-6432-0.
19. SCHINDLER, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-802-4731-704.
20. RICHTER, E., S. RÜSCH-GERDES a D. HILLEMANN. Drug-susceptibility testing in TB: current status and future prospects. *Expert Review of Respiratory Medicine* [online]. 2009, vol. 3, issue 5, s. 497-510 [cit. 2014-04-27]. DOI: 10.1586/ers.09.45. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/ers.09.45>
21. PALOMINO, J. C., A. MARTIN a F. PORTAELS. Rapid drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: a review of colourimetric methods. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2007, vol. 13, issue 8, s. 754-762 [cit. 2014-04-27]. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01698.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-0691.2007.01698.x>
22. KIM, S. J. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *European Respiratory Journal* [online]. 2005-03-01, vol. 25, issue 3, s. 564-569 [cit. 2014-04-27]. DOI: 10.1183/09031936.05.00111304. Dostupné z: <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.05.00111304>

23. O společnosti. *Česká pneumologická a fyziologická společnost*. [online]. 2014 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: <http://www.pneumologie.cz/>
24. CHALABALA, M. a M. LEHKÝ. *Materia pharmaceutica*. Martin: Vydavatelství Osveta, 1992. ISBN 80-217-0219-2.
25. SIMON, C. a W. STILLE. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. Praha: Grada Publishing, spol.s r. o., 1998.
26. Tuberculosis. *Centers for Disease Control and Prevention*. [online]. 2014 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/tb/topic/drtb/default.html>
27. WHO Global Task Force outlines measures to combat XDR-TB worldwide. *WHO*. [online]. 2014 [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2006/np29/en/>
28. MATTEELLI, A., A. ROGGI a A. C. C. CARVALHO. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. *Clinical Epidemiology* [online]. 2014, roč. 6, s. 111-118 [cit. 2014-04-28]. DOI: 10.2147/CLEP.S35839. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/extensively-drug-resistant-tuberculosis-epidemiology-and-management-peer-reviewed-article-CLEP>
29. ŠPÁSOVÁ, I. a Z. PARÁKOVÁ. *Pneumologie 2000: aktuality oboru TRN*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2000. ISBN 80-862-2505-4.
30. MOLINA-TORRES, C. A., A. BARBA-MARINES, O. VALLES-GUERRA, J. OCAMPO-CANDIANI, N. CAVAZOS-ROCHA, M. J. PUCCI, J. CASTRO-GARZA a L. VERA-CABRERA. Intracellular activity of tedizolid phosphate and ACH-702 versus Mycobacterium tuberculosis infected macrophages. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. 2014, vol. 13, issue 1, s. 13-

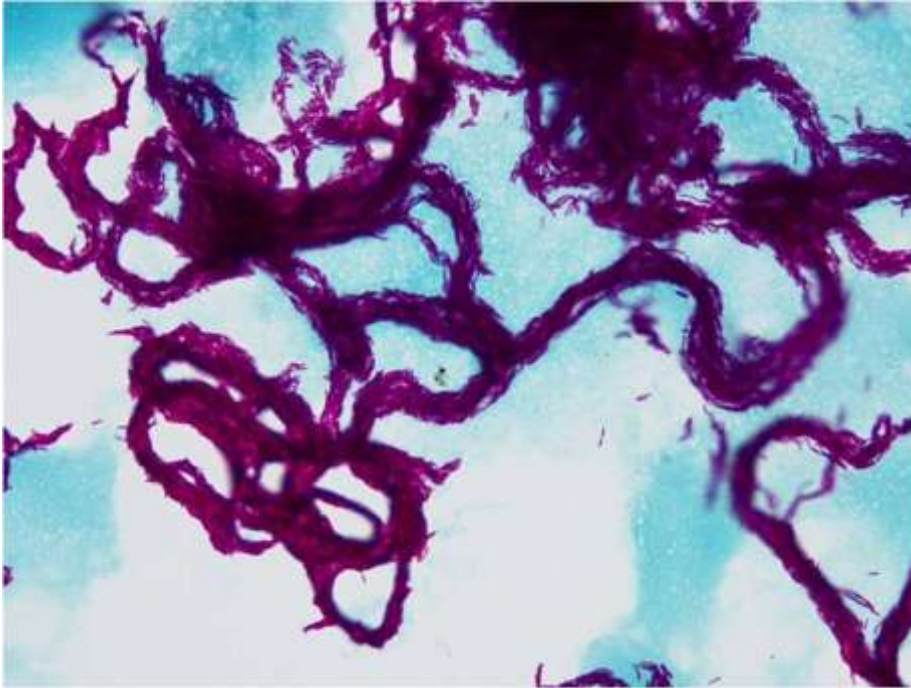
[cit. 2014-04-27]. DOI: 10.1186/1476-0711-13-13. Dostupné z: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/13/1/13>

31. Global tuberculosis report 2013. *WHO*. [online]. 2014 [cit. 2014-04-04]. Dostupné z:
z:
http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr13_executive_summary.pdf?ua=1
32. DIWAN, V. K. a A. THORSON. Sex, gender, and tuberculosis. *The Lancet* [online]. 1999, roč. 353, č. 20, s. 1000-01 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z:
<http://www.hawaii.edu/hivandaids/Sex,%20Gender,%20and%20Tuberculosis.pdf>
33. LONG, N. H., E. JOHANSSON, V. K. DIWAN a A. WINKVIST. Different tuberculosis in men and women: beliefs from focus groups in Vietnam. *Social Science* [online]. 1999, vol. 49, issue 6, s. 815-822 [cit. 2014-04-27]. DOI:
10.1016/S0277-9536(99)00171-9. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0277953699001719>
34. DOLIN, P. J., M. C. RAVIGLIONE a A. KOCHI. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bulletin of the World Health Organization* [online]. 1994, roč. 72, č. 2, s. 213-220 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z:
<http://europepmc.org/articles/PMC2486541?pdf=render>
35. DAS, D., M. BAKER, L. CALDER. Tuberculosis epidemiology in New Zealand: 1995-2004. *Journal of the New Zealand Medical Association* [online]. 2006, roč. 119, č. 1243 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://journal.nzma.org.nz/journal/119-1243/2249/>

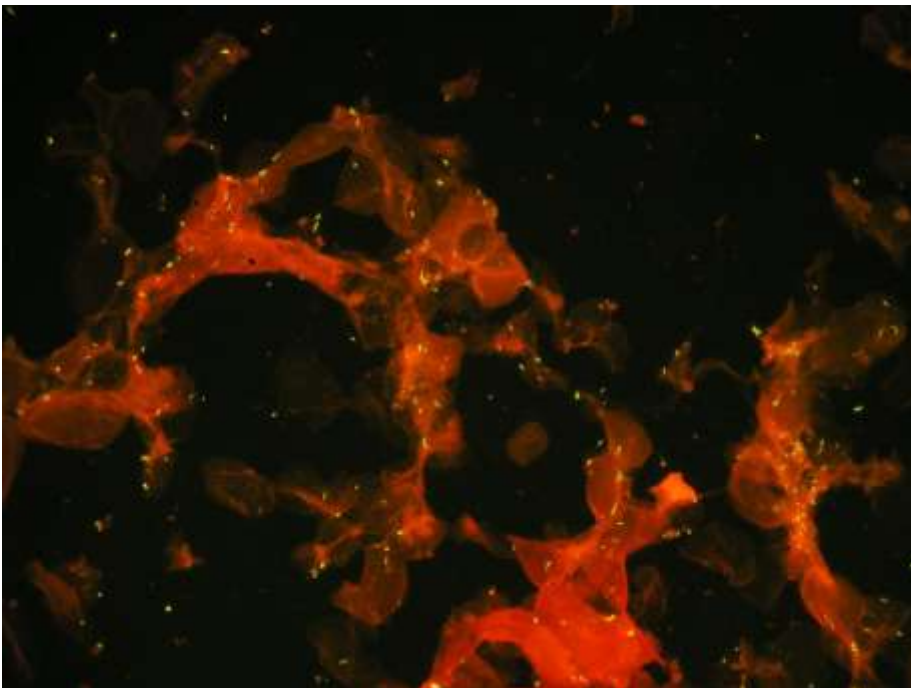
36. YU, F. L., J. Ch. LEE, M. S. WANG, H. L. HSU, T. T. CHEN, Ch. L. CHENG, Y. Y. YANG, G. Ch. WANG a M. Ch. YU. Evaluation of a modified direct agar proportion method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from MGIT samples. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* [online]. 2014, s. - [cit. 2014-04-27]. DOI: 10.1016/j.jmii.2014.01.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1684118214000061>
37. TORTOLI, E., M. BENEDETTI, A. FONTANELLI a M. T. SIMONETTI. Evaluation of Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Four Major Antituberculous Drugs: Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method and the Agar Plate Method of Proportion. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2002-02-01, vol. 40, issue 2, s. 607-610 [cit. 2014-04-28]. DOI: 10.1128/JCM.40.2.607-610.2002. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.40.2.607-610.2002>
38. ANGRA, P. K., T. H. TAYLOR, M. F. IADEMARCO, B. METCHOCK, J. R. ASTLES a J. C. RIDDERHOF. Performance of Tuberculosis Drug Susceptibility Testing in U.S. Laboratories from 1994 to 2008. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2012-03-16, vol. 50, issue 4, s. 1233-1239 [cit. 2014-04-28]. DOI: 10.1128/JCM.06479-11. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.06479-11>
39. PILLAY, M. a A. W. STURM. Evolution of the Extensively Drug-Resistant F15/LAM4/KZN Strain of *Mycobacterium tuberculosis* in KwaZulu-Natal, South Africa. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2007-12-01, vol. 45, issue 11, s. 1409-1414 [cit. 2014-04-27]. DOI: 10.1086/522987. Dostupné z: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/522987>

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Barvení dle Ziehl-Neelsena – *M. tuberculosis* [ÚM – MUDr. Amlerová]



Příloha 2: Fluorescence – *M. tuberculosis* [ÚM – MUDr. Amlerová]



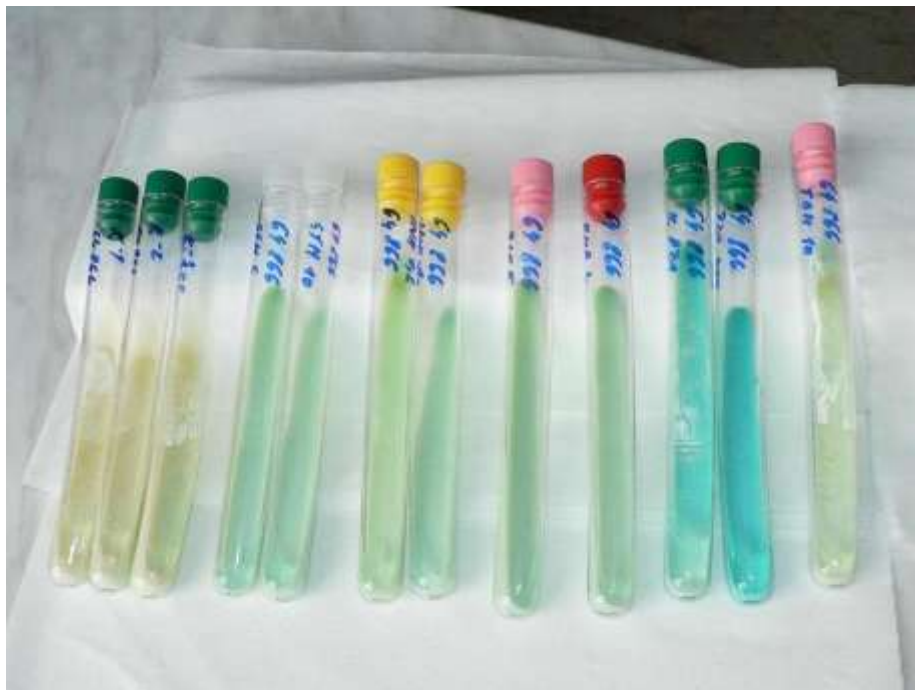
Příloha 3: BACTEC® MGIT™ 960 [ÚM – MUDr. Amlerová]



Příloha 4: Kolonie *M. tuberculosis* na pevných kultivačních půdách [ÚM – MUDr. Amlerová]



Příloha 5: Proporční metoda- pŮdy s testovanými léky [ÚM – MUDr. Amlerová]



Příloha 6: Testování citlivosti v BACTEC® MGIT™ 960 – zkumavky s testovanými léčivy [ÚM – MUDr. Amlerová]



Příloha 7: Výsledek vyhodnocený přístrojem BACTEC® MGIT™ 960 [ÚM – MUDr. Amlerová]

BACTEC MGIT 960

Unloaded AST Set Report

Instrument Number	Current Date/Time	Temperature			Software Version	Page Number
		A	B	C		
1	10/02/14 08:04	36.6°C	36.9°C	36.5°C	V5.02A	1

Sequence No: 439550016853 TIP: 5;2 SOP: 04/02/14 10:34 Removed Date: 10/02/14

Tube Position	Growth Unit	Status	Concentration	Drug Name
C/H16	400	C		Growth Control
C/H17	0	S	1.00 ug/mL	Streptomycin
C/H18	0	S	0.10 ug/mL	Isoniazid
C/H19	0	S	1.00 ug/mL	Rifampin
C/H20	0	S	9.00 ug/mL	Ethambutol

Sequence No: 439220018103 TIP: 5;9 SOP: 04/02/14 10:35 Removed Date: 10/02/14

Tube Position	Growth Unit	Status	Concentration	Drug Name
C/J01	400	C		Growth Control
C/J02	0	S	100.0 ug/mL	Pyrazinamide

END OF AST SETS