

MASARYKOVA UNIVERZITA

Lékařská fakulta

NÁLEZY NETUBERKULÓZNÍCH MYKOBAKTERIÍ
V KLINICKÉM MATERIÁLU

Bakalářská práce
v oboru Zdravotní laborant

Vedoucí bakalářské práce:
Mgr. Monika Dvořáková Heroldová, Ph.D.

Autor:
Martina JELÍNKOVÁ

Brno, duben 2016

Jméno a příjmení autora: Martina Jelínková

Název bakalářské práce: Nálezy netuberkulózních mykobakterií v klinickém materiálu

Pracoviště: Mikrobiologický ústav, FN u sv. Anny v Brně

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Monika Dvořáková Heroldová, Ph.D.

Rok obhajoby bakalářské práce: 2016

Souhrn:

Netuberkulózní mykobakteria jsou podmíněně patogenní mikroorganismy vyskytující se běžně v prostředí a jsou to původci infekcí (mykobakterióz) především u imunokompromitovaných pacientů. Mohou však vyvolávat onemocnění také u jedinců s dostatečnou funkcí imunitního systému.

Práce obsahuje teoretické informace o rodu *Mycobacterium*, o mykobakteriálních infekcích a možnostech mykobakteriální diagnostiky. Praktická část popisuje diagnostické postupy, které byly zvoleny pro průkaz přítomnosti mykobakterií ve vyšetřovaných vzorcích, a dále zahrnuje statistické vyhodnocení údajů uvedených na žádankách o vyšetření a statistické vyhodnocení výsledků mykobakteriálního vyšetření.

Klíčová slova: *Mycobacterium*, netuberkulózní mykobakterie, mykobakterióza, epidemiologie

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Moniky Dvořákové Heroldové, Ph.D. a uvedla v seznamu literatury všechny literární a odborné zdroje.

V Brně dne 28. dubna 2016

.....

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Monice Dvořákové Heroldové, Ph.D. za její odborné rady, připomínky a čas, který mi při konzultacích věnovala. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Antonii Lundové za ochotu vysvětlit mi potřebné laboratorní techniky a za možnost podílet se na zpracování vyšetřovaných vzorků. Mé poděkování patří také rodině a přátelům za jejich podporu.

Použité symboly a zkratky

AIDS	z anglického <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> ; česky Syndrom získaného selhání imunity
ARK FNUSA	Anesteziologicko-resuscitační klinika Fakultní nemocnice u sv. Anny
ART	acidorezistentní tyčinky
BAL	bronchoalveolární laváž
BAT	bronchoalveolární tekutina
CKTCH Brno	Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie Brno
DNA	z anglického <i>deoxyribonucleic acid</i> , česky deoxyribonukleová kyselina
FNUSA	Fakultní nemocnice u sv. Anny
HIV	z anglického <i>Human Immunodeficiency Virus</i> , česky virus lidské imunodeficiency
HPLC	z anglického <i>high-performance liquid chromatography</i> , česky vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRCT	z anglického <i>high-resolution computed tomography</i> , česky vysokorozlišovací počítačová tomografie
I. IKAK FNUSA	I. interní kardioangiologická klinika Fakultní nemocnice u sv. Anny
KOChHK FNUSA	Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice u sv. Anny
LIS	laboratorní informační systém
LV	laryngeální výtěr
MAC/MAI	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> komplex
MiÚ FNUSA	Mikrobiologický ústav Fakultní nemocnice u sv. Anny
MKN	Mezinárodní klasifikace nemocí
MOTT	z anglického <i>mycobacteria other than (Mycobacterium) tuberculosis</i> , česky mykobakterie jiné než (<i>Mycobacterium) tuberculosis</i>
MOÚ	Masarykův onkologický ústav

MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NTM	netuberkulózní mykobakteria
PCR	z anglického <i>polymerase chain reaction</i> , česky polymerázová řetězová reakce
RNA	z anglického <i>ribonucleic acid</i> , česky ribonukleová kyselina
RTG	rentgenové vyšetření
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky

Obsah

1	Úvod.....	- 10 -
2	Teoretická část.....	- 11 -
2.1	Taxonomické zařazení mykobakterií	- 11 -
2.2	Historie poznatků o rodu <i>Mycobacterium</i>	- 12 -
2.3	Vlastnosti mykobakterií.....	- 14 -
2.3.1	Morfologie	- 14 -
2.3.2	Metabolismus, biochemické vlastnosti a růst mykobakterií	- 16 -
2.3.3	Odolnost vůči vlivům zevního prostředí.....	- 16 -
2.3.4	Mykobakteriální genom	- 17 -
2.4	Přirozený výskyt NTM a epidemiologie	- 17 -
2.5	Formy mykobakteriálních infekcí	- 18 -
2.5.1	Plicní onemocnění.....	- 18 -
2.5.2	Lokální lymfadenitida.....	- 19 -
2.5.3	Infekce postihující kůži a měkké tkáně.....	- 19 -
2.5.4	Diseminované infekce.....	- 20 -
2.6	Diagnostika mykobakterióz.....	- 21 -
2.6.1	Klinický nález, symptomatologie	- 21 -
2.6.2	Zobrazovací metody	- 21 -
2.6.3	Laboratorní průkaz přítomnosti mykobakterií v klinickém materiálu.....	- 22 -
2.6.3.1	Odběr vzorku.....	- 22 -
2.6.3.2	Dekontaminace, homogenizace a neutralizace vzorků	- 22 -
2.6.3.3	Mikroskopie	- 23 -
2.6.3.4	Kultivace	- 24 -
2.6.3.4.1	Kultivační půdy.....	- 24 -
2.6.3.4.2	Kultivace v automatických systémech.....	- 25 -
2.6.3.5	Identifikace netuberkulózních mykobakterií.....	- 26 -

2.6.3.5.1	Testy biochemické aktivity	- 26 -
2.6.3.5.2	Chromatografické metody	- 29 -
2.6.3.5.3	Molekulárně-biologické metody.....	- 29 -
2.6.3.6	Testy citlivosti na antituberkulotika.....	- 30 -
3	Praktická část	- 31 -
3.1	Cíl práce.....	- 31 -
3.2	Hypotézy.....	- 31 -
3.3	Soubor pacientů	- 32 -
3.4	Použitý materiál a metody	- 32 -
3.4.1	Reagencie, materiál a přístrojové vybavení	- 32 -
3.4.2	Postupy a hodnocení	- 36 -
3.4.2.1	Příjem klinického materiálu	- 36 -
3.4.2.2	Mikroskopický průkaz	- 37 -
3.4.2.3	Kultivace	- 38 -
3.4.2.3.1	Příprava materiálu před inokulací.....	- 38 -
3.4.2.3.2	Urychlená kultivace	- 39 -
3.4.2.3.3	Klasická kultivace ve zkumavkách.....	- 42 -
3.4.2.4	Identifikace etiologického agens.....	- 44 -
3.5	Výsledky.....	- 45 -
3.5.1	Zpracovávaná data	- 45 -
3.5.1.1	Odesílající pracoviště	- 45 -
3.5.1.2	Údaje o pohlaví a věku pacientů	- 47 -
3.5.1.3	Diagnózy pacientů.....	- 48 -
3.5.1.4	Vyšetřované vzorky	- 51 -
3.5.1.5	Pozitivní výsledky	- 52 -
3.5.1.6	Identifikované mykobakteriální druhy	- 53 -
3.5.1.7	Věk a diagnózy pozitivních pacientů	- 54 -

3.6	Diskuze	- 57 -
3.7	Závěr.....	- 62 -
4	Použitá literatura	- 63 -
5	Seznam obrázků	- 70 -
6	Seznam tabulek.....	- 70 -
7	Seznam grafů	- 71 -

1 Úvod

Netuberkulózní mykobakterie, stejně jako *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium leprae*, jsou taxonomicky řazeny do rodu *Mycobacterium*. V minulosti byly označovány řadou dalších názvů - atypické mykobakterie, mykobakterie jiné než *M. tuberculosis* (MOTT) nebo environmentální mykobakterie, v současné době však převládá označení „netuberkulózní“, v souladu s nomenklaturou American Thoracic Society (Falkinham c1996; Chemlal a Portaels 2003).

Netuberkulózní mykobakterie osidlují všechny složky životního prostředí - půdu, vzduch, vodu, dokonce i chlorovanou pitnou vodu. Jsou to oportunní patogeny, které vyvolávají infekce označované jako mykobakteriózy. Tyto infekce jsou charakteristické rozvojem granulomatózního zánětu v místě průniku bakterií do organismu (Tille 2014; World Health Organisation 1991).

Mykobakteriózy se rozvíjejí především u jedinců s poruchou imunitního systému, ať už vrozenou nebo získanou v průběhu života. Vysoce rizikovou skupinou jsou jedinci s AIDS, onkologičtí pacienti, ale také pacienti podstupující imunosupresivní terapii po transplantaci nebo z důvodu léčby autoimunitního onemocnění či některých typů nádorů. Zvýšené riziko rozvoje mykobakteriální infekce je charakteristické také pro starší osoby, u nichž s přibývajícím věkem přirozeně dochází k útlumu funkcí imunitního systému. U takto predisponovaných jedinců mohou být mykobakteriální infekce až život ohrožující. Aby mohla být včas zahájena adekvátní terapie, je nezbytně nutné, aby byl laboratorní průkaz mykobakteriálních agens přesný a co nejrychlejší. Mykobakteriální infekce však může postihnout i imunokompetentního jedince (Caminero Luna 2004; Falkinham c1996).

Mykobakteriální diagnostika na Mikrobiologickém ústavu Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně je postavena na mikroskopickém a kultivačním průkazu mykobakterií v klinickém materiálu. V rámci tématu tuberkulózy a ostatních mykobakterióz má velký přínos také statistické vyhodnocení informací o vyšetřovaných pacientech a statistické zhodnocení výsledků vyšetření, což je jeden z cílů této práce.

2 Teoretická část

2.1 Taxonomické zařazení mykobakterií

Všechny mykobakterie jsou v systému živých organismů taxonomicky zařazeny následujícím způsobem:

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Actinobacteria*

Třída: *Actinobacteria*

Podtřída: *Actinobacteridae*

Řád: *Actinomycetales*

Podřád: *Corynebacterineae*

Čeleď: *Mycobacteriaceae*

Rod: *Mycobacterium*

Rod *Mycobacterium* v současné době zahrnuje 174 druhů a 13 poddruhů, přičemž některé se uplatňují jako obligátní (vždy vyvolávající onemocnění), jiné jako podmíněné (onemocnění vyvolávající jen za určitých podmínek) patogeny. Existují také druhy, které nejsou klinicky významné (Euzéby 2010; Sedláček 2007).

Mezi obligátně patogenní mykobakteria řadíme zástupce komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, z nichž je u člověka nejběžnější druh *Mycobacterium tuberculosis*, do této skupiny však patří také druhy *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae* a *Mycobacterium microti*. Tito zástupci vyvolávají u člověka i u jiných savců tuberkulózu. Dalším striktním patogenem je *Mycobacterium leprae*, původce lepry (Greenwood a kol. 2007; de la Maza a kol. 2004).

Podmíněně neboli potenciálně patogenními jsou netuberkulózní mykobakteria (NTM), žijící obvykle saprofytickým způsobem života v zevním prostředí. U predisponovaných osob, ale někdy i u zdravých jedinců mohou způsobovat mykobakteriízy (Votava a kol. 2010).

2.2 Historie poznatků o rodu *Mycobacterium*

Původci lepry a tuberkulózy byli prokázáni v druhé polovině 19. století. Písemné záznamy o těchto onemocněních sahají až do starověku (Beránková 2010; Šťastná 2011). *M. leprae* bylo objeveno v roce 1873 norským lékařem Gerhardem Henrikem Armauerem Hansenem a označuje se též Hansenův bacil. *M. tuberculosis* neboli Kochův bacil, bylo poprvé popsáno roku 1882 a pojmenováno po svém objeviteli, pruském lékaři Robertu Kochovi (Greenwood a kol. c2007; Votava a kol. 2010).

Netuberkulózní mykobakteria jsou stejně jako *M. tuberculosis* známá už od konce 19. století, avšak pro svůj přirozený výskyt v prostředí byla dlouho považována za pouhé kontaminanty vzorků (Falkinham 2009; Greenwood a kol. c2007). Dlouhou dobu nebyla ani přesně taxonomicky zařazena. Až v 50. letech 20. století se opět zvýšil zájem o NTM jakožto původce onemocnění. Roku 1959 americký botanik a mikrobiolog Ernest Runyon rozdělil netuberkulózní mykobakteria do 4 skupin podle jejich schopnosti tvořit pigment, rychlosti růstu a nároků na teplotu (tab. 1). Mezi pomalu rostoucí NTM patří **fotochromogeny**, **skotochromogeny** a **non-chromogeny**. Čtvrtou skupinu tvoří **rychle rostoucí** mykobakteria, která mohou být fotochromogenní, skotochromogenní i netvořící pigment (Greenwood a kol. c2007).

Další vlna zájmu o NTM jakožto o původce mykobakterióz se zvedla v 80. letech 20. století, kdy se začaly objevovat první případy pacientů se syndromem získaného selhání imunity - AIDS, u nichž jsou tyto infekce jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Tato skutečnost vedla v 80. a 90. letech minulého století k potřebě zpřesnit informace o taxonomii, epidemiologii, ekologii a genetické výbavě mykobakterií a dále k nutnosti podrobněji prozkoumat patogenizi mykobakteriálních onemocnění. Pro tyto účely byly do současné doby vyvinuty nové technologie (především molekulárně genetické metody) k detekci a identifikaci dosud neobjevených, ale také již známých mykobakteriálních druhů. Předpokládá se, že tento trend bude pokračovat i v následujících letech (Covert a kol. 1999; Falkinham c1996; Chemlal a Portaels 2003).

Tab. 1. Přehled nejznámějších druhů mykobakterií a jejich vlastností (upraveno podle Greenwood a kol. 1999; Greenwood a kol. c2007; de la Maza a kol. 2004)

Runyonova skupina	pigment	druh
I: fotochromogen	ANO po expozici světlu	<i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i> <i>M. marinum</i>
II: skotochromogen	ANO při kultivaci v temnu	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. gordonae</i>
III: non-chromogen	NE	<i>M. avium-intracellulare</i> komplex: <i>M. avium ssp. avium</i> <i>M. avium ssp. paratuberculosis</i> <i>M. avium ssp. intracellulare</i> <i>M. avium ssp. sylvaticum</i> <i>M. avium ssp. lepraemurium</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. celatum</i> <i>M. branderi</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. genavense</i> komplex <i>M. terrae</i> : <i>M. terrae</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. triviale</i>
IV: rychle rostoucí mykobakterie	NĚKTERÉ	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. flavescens</i>

2.3 Vlastnosti mykobakterií

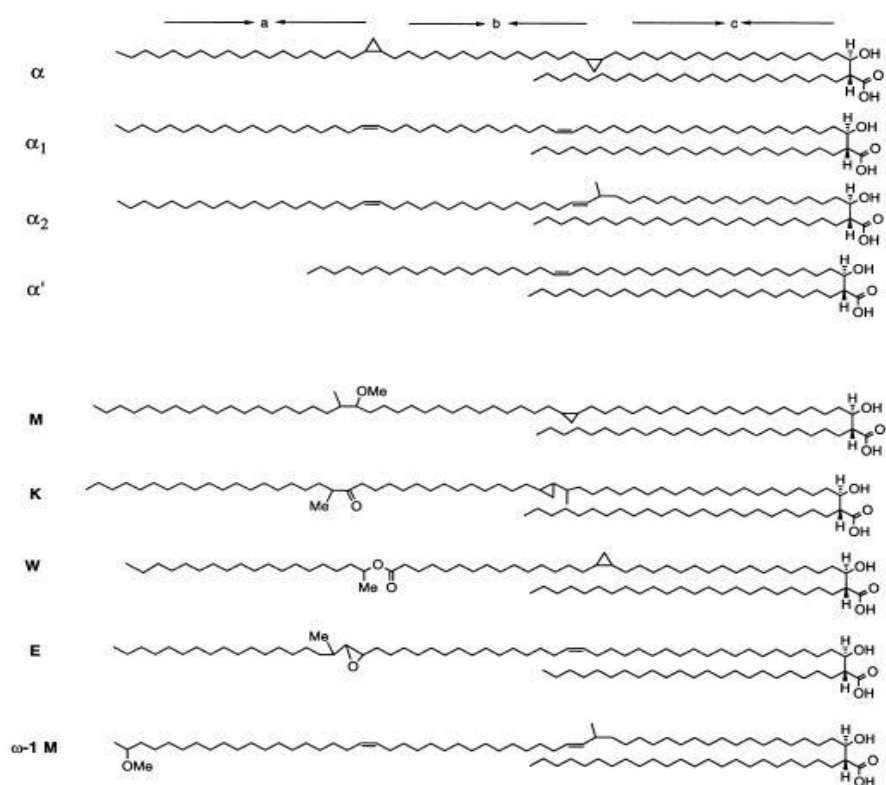
2.3.1 Morfologie

Mykobakteria v mikroskopu vidíme jako štíhlé, rovné nebo mírně zakřivené tyčinky. Jsou to nepohyblivé, nesporulující a acidorezistentní bakterie. Jejich acidorezistence je dána odlišnou strukturou jejich buněčné stěny oproti skladbě buněčné stěny grampozitivních či gramnegativních bakterií. Acidorezistence buněčné stěny způsobuje odolnost mykobakterií vůči běžným barvivům. Fixované preparáty tedy nelze barvit dle Gramova barvení, ale používá se barvení dle Ziehl-Neelsena, případně fluorescenční barvení (Sedláček 2007; Votava a kol. 2010).

Buněčná stěna mykobakterií je charakteristická svým složením. Na cytoplazmatickou membránu nasedá vrstva **peptidoglykanu** (mureinu). Vrstvu nad peptidoglykanem tvoří **arabinogalaktan**, na který se kovalentně váží mastné kyseliny. Nejdůležitějšími z nich jsou molekuly **mykolových kyselin**, které rod *Mycobacterium* jednoznačně odlišují od ostatních členů podřádu *Corynebacterineae* - rodů *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* a dalších (Crellin, Luo a Morita 2013).

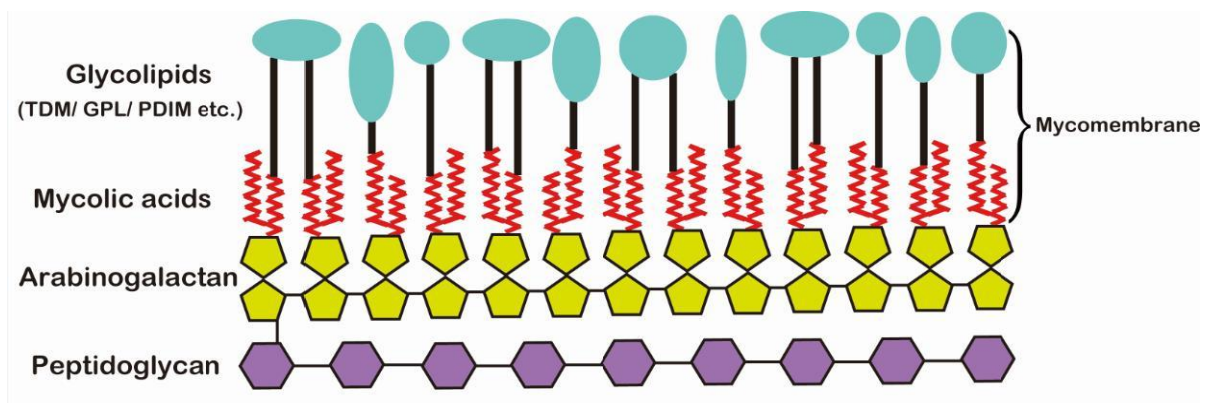
Mykolové kyseliny jsou lineární α -alkyl- β -hydroxy mastné kyseliny s vysokým počtem atomů uhlíku (60 až 90). Podle dalších funkčních skupin v jejich struktuře rozlišujeme různé typy mykolových kyselin (obr. 1). Nejčastějšími jsou α - (cyklopropanové kruhy), methoxy- či keto-mykolové kyseliny (Barry a kol. 1998). Jako příklad těchto mastných kyselin lze uvést kyselinu mykocerovou či tuberkulostearovou, které je možné využít v diagnostice a druhové identifikaci (Bednář a kol. 1996).

Buněčnou stěnu zevně obaluje ještě vrstva glykolipidů, případně fosfolipidů a lipoproteinů, které ve vazbě s mykolovými kyselinami tvoří vnější „mykomembránu“ a zodpovídají za její hydrofobní vlastnosti, tudíž i za neschopnost přijmout běžně používaná barviva pro přípravu barvených preparátů a odolnost vůči mnohým antimikrobiálním látkám (obr. 2) (Crellin, Luo a Morita 2013).



Obr. 1. Typy mykolových kyselin s charakteristickými funkčními skupinami
(upraveno podle Barry a kol. 1998)

M - methoxy, K - keto, W - wax ester, E - epoxy, ω -1 M - ω -1 methoxy



Obr. 2. Stavba buněčné stěny mykobakterií (upraveno podle Crellin, Luo a Morita 2013)

2.3.2 Metabolismus, biochemické vlastnosti a růst mykobakterií

Netuberkulózní mykobakteria jsou z hlediska vztahu ke kyslíku považována za **aerobní** bakterie, protože ke svému růstu vyžadují kyslík v koncentraci běžné v atmosférickém vzduchu. Zdrojem energie a uhlíku je pro ně štěpení organických sloučenin, jde tedy o mikroorganismy **chemoorganotrofní** (Sedláček 2007).

Většina netuberkulózních mykobakterií, vyjma *M. gastri*, produkuje enzym katalázu. Určité druhy lze také odlišit na základě katalytické aktivity enzymu arylsulfatázy. Dále NTM produkují a akumulují niacin, přičemž míra jeho produkce je různá u jednotlivých druhů, a dokonce i izolátů. Některé druhy NTM lze rozeznat i na základě jejich schopnosti redukovat nitrát či tellurid (Tille 2014).

Jednou ze stěžejních vlastností velké části mykobakterií je také produkce karotenoidů, tedy tvorba různých pigmentů v odstínech žluté až červené, které vytváří typicky zbarvené kolonie. Tvorba a množství pigmentu závisí na druhu mykobakteria (Sedláček 2007; Tille 2014). Na základě toho rozlišujeme tři skupiny pomalu rostoucích NTM, viz kapitola 2.2 Historie poznatků o rodu *Mycobacterium*. **Fotochromogeny** vytváří pigment po inkubaci v temnu, kdy narostou nepigmentované kolonie, a následně expozici světlu za vzniku žlutého pigmentu. **Skotochromogeny** produkují pigment pouze při kultivaci v temnu. **Non-chromogeny** nesyntetizují pigment za žádných podmínek (Greenwood a kol. c2007; Tille 2014).

2.3.3 Odolnost vůči vlivům zevního prostředí

V důsledku hydrofobní a acidorezistentní struktury buněčné stěny jsou mykobakteria poměrně odolná vůči vysychání, nekonzentrovaným kyselinám a louhům a dokonce i vůči mnohým biocidním látkám. Detergenty životaschopnost mykobakterií neovlivňují. Oxidační činidla a halogeny lze použít v případě, že jejich koncentrace bude dostatečně vysoká a přípravek necháme působit dostatečně dlouhou dobu. Příkladem je 0,5% Persteril, až 5%

chloramin B nebo 1% Jodonal B. Nejúčinnější jsou však deriváty fenolu jako například lyzol, a dále aldehydy, nejběžněji formaldehyd či glutaraldehyd (Votava a kol. 2010).

Mykobakteria jsou teplotně nenáročnými mikroorganismy, dobře snášejí široké rozpětí pH, salinity a koncentrace kyslíku. Tyto vlastnosti umožňují jejich přežití v rozmanitých prostředích (Falkinham c1996).

2.3.4 Mykobakteriální genom

Mykobakteriální genom je relativně rozsáhlý. Jeho velikost činí $3 - 4 \times 10^9$ bp, podíl guaninu-cytosinu se pohybuje mezi 65 až 70 mol%. Některé druhy navíc mají extrachromozomální DNA uloženou v plasmidech. Mykobakteriální DNA obsahuje typické repetitivní sekvence velikosti 5 kb, přičemž stanovení jejich počtu a polohy v řetězci slouží jako metoda tzv. molekulární epidemiologie (Bednář a kol. 1996). Počet genů pro rRNA je však u rodu *Mycobacterium* malý. Pomalu rostoucí druhy jako *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. simiae* a *M. marinum* mají pouze jedinou kopii genů pro 16S, 23S a 5S rRNA. Naproti tomu většina rychle rostoucích mykobakterií má dvě kopie těchto genů, výjimkou jsou *M. chelonae* a *M. abscessus* (jedna kopie). Rychlost růstu pomalu rostoucích mykobakterií je tedy limitována rychlostí syntézy proteinů, která je omezena právě malým počtem genů pro rRNA (Falkinham c1996).

2.4 Přirozený výskyt NTM a epidemiologie

Většina netuberkulózních mykobakterií se vyskytuje ve volné přírodě, rozšíření je celosvětové. Žijí saprofytický v půdě, bažinách, ve vodě - sladké, slané, brakické, říční, studniční. Osidlují také uměle vytvořené systémy pro rozvod pitné vody. Člověk s nimi tedy přichází do styku neustále, avšak díky nízké virulenci těchto mikrobů obvykle nedochází k rozvoji onemocnění. K nákaze dochází převážně u imunodeficientních pacientů, ať už je

tento deficit vrožený či získaný (zejména AIDS, imunosupresivní léčba). Onemocnění vyvolané netuberkulózními mykobakteriemi se však může rozvinout i u imunokompetentního jedince (Greenwood a kol. c2007). K nákaze dochází při kontaktu jedince s prostředím, ve kterém se mykobakterie nacházejí. Dále může být nákaza nozokomiální (vznikající v souvislosti s hospitalizací pacienta) či iatrogenní (vyvolaná zásahem lékaře nebo jiného zdravotníka, například při použití špatně sterilizovaných či dezinfikovaných pomůcek). Mezilidský přenos je vzácný, je-li vůbec možný (de la Maza a kol. 2004; Tortoli 2009).

V zemích s nízkou incidencí tuberkulózy se plicní NTM infekce v současnosti vyskytují častěji než tuberkulóza (Arend, van Soolingen a Ottenhoff. 2009). Nález netuberkulózních mykobakterií v klinickém materiálu však nemusí vždy znamenat onemocnění pacienta. Jejich přítomnost může být způsobena také odběrem materiálu do odběrových nádobek čištěných kontaminovanou vodovodní vodou, případně může jít o kontaminaci barvicími roztoky s obsahem kontaminované vody (Greenwood a kol. c2007).

2.5 Formy mykobakteriálních infekcí

Vstupní bránou mykobakterií jsou sliznice respiračního traktu, trávicího traktu a dále kůže po traumatu. Na základě toho rozlišujeme čtyři formy mykobakteriálních infekcí:

- plicní onemocnění
- lokální lymfadenitida
- infekce postihující kůži a měkké tkáně
- diseminované infekce (Caminero Luna 2004; Greenwood a kol. c2007).

2.5.1 Plicní onemocnění

Plicní forma mykobakterióz se rozvíjí u jedinců s vroženým či získaným imunodeficitem, s nádorovým onemocněním, cystickou fibrózou a jinými onemocněními ovlivňujícími funkce imunitního systému, ale část pacientů s plicní mykobakteriózou jsou zcela imunokompetentní

jedinci, nejvíce známky jakéhokoliv predisponujícího onemocnění (Greenwood a kol. c2007). Nejčastějším původcem je MAC komplex, v Evropě dále *Mycobacterium xenopi* a *Mycobacterium malmoense*. V USA je převládajícím původcem plicních onemocnění *Mycobacterium kansasii* (Greenwood a kol. c2007; Tortoli 2009).

2.5.2 Lokální lymfadenitida

Lymfadenitida se vyskytuje převážně u dětí do 5 let věku, postižena bývá jedna z krčních uzlin. Etiologickým agens infekce bývá *Mycobacterium scrofulaceum* a stále častěji také komplex *Mycobacterium avium-intracellulare*. Také byly popsány případy lymfadenitidy vyvolané druhem *Mycobacterium haemophilum* (obr. 3). Nejúčinnější formou léčby je excize uzliny. Lymfadenitida způsobená mykobakteriemi se také rozvíjí u imunokompromitovaných jedinců, obzvláště u pacientů s AIDS (Greenwood a kol. c2007; Tortoli 2009).



Obr. 3. Lymfadenitida u dítěte způsobená druhem *M. haemophilum* (Lindeboom a kol. 2005)

2.5.3 Infekce postihující kůži a měkké tkáně

Kožní infekce vznikají v důsledku průniku mykobakterií do poraněné kůže, a to i po lékařském zásahu (Murray, Rosenthal a Pfaller 2013). Nejčastěji je postižena oblast rukou, obočí, kolen a chodidel. V místě poškození se rozvíjí granulomatózní léze (Tortoli 2009).

Příčinou těchto infekcí běžně bývají rychle rostoucí druhy jako *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* a méně často *Mycobacterium peregrinum* (Greenwood a kol. c2007).

Charakteristickou kožní infekci způsobuje pomalu rostoucí druh *Mycobacterium marinum*. V místě léze (nejčastěji na ruce) se rozvíjí zánětlivý proces, jehož výsledkem je tzv. plovárenský granulom, někdy také granulom akvaristů. Infekce se objevuje zejména u uživatelů plaveckých bazénů, akvaristů a lidí v kontaktu s rybami (Tortoli 2009, Votava a kol. 2010).

Mycobacterium ulcerans produkuje toxin, který v místě zánětu vede ke vzniku tzv. burulského vředu (obr. 4) (Tortoli 2009).



Obr. 4. Burulský vřed na levém kotníku (Amofah a kol. 2002)

2.5.4 Diseminované infekce

Diseminované mykobakteriální infekce se často rozvíjejí u imunokompromitovaných pacientů, zejména těch infikovaných virem HIV. Tato onemocnění se projevují horečkou, průjmami, ztrátou váhy, bolestmi v břišní oblasti, pocením, anémií, hepatomegálií a splenomegálií. Tyto infekce jsou velmi závažné, mnohdy život ohrožující. U HIV pozitivních jedinců je nejčastějším původcem *Mycobacterium avium-intracellulare*, dále *Mycobacterium genavense*. Příčinou diseminací u imunosuprimovaných jedinců mohou být kromě členů komplexu *Mycobacterium avium-intracellulare* také *Mycobacterium chelonae* či *Mycobacterium haemophilum* (Greenwood a kol. c2007; Tortoli 2009).

2.6 Diagnostika mykobakterióz

2.6.1 Klinický nález, symptomatologie

Klinický nález u pacientů je dán typem a rozsahem infekce, základním onemocněním a komorbiditami (Arend, van Soolingen a Ottenhoff 2009).

Příznaky plicních mykobakteriálních infekcí obvykle odpovídají konkomitantnímu plicnímu onemocnění (chronická obstrukční plicní nemoc, cystická fibróza, bronchiektázie, pneumokoniózy, primární ciliární dyskineza apod.) a jsou nespecifické. Mezi časté symptomy respirační infekce vyvolané mykobakteriemi patří dlouhodobý kašel, expektorace sputa, hemoptýza, dušnost, únava, noční pocení, horečka či hubnutí (Bártů 2009).

Charakteristické jsou některé mimoplicní formy mykobakteriální infekce - granulomatózní léze na kůži či v měkkých tkáních (Tortoli 2009; Votava a kol. 2010).

2.6.2 Zobrazovací metody

Ze zobrazovacích technik se zejména v případě plicní formy mykobakteriálních infekcí využívá rentgenové vyšetření hrudníku. Pokud prosté RTG vyšetření neposkytuje dostatečné informace, lze využít metodu vysokorozlišovací výpočetní tomografie (HRCT) (Arend, van Soolingen a Ottenhoff 2009; Agrawal 2014).

Na snímcích se sledují bronchiektázie, bronchioloektázie, přítomnost nodulů, konsolidace tkáně a kavitace, avšak rentgenové nálezy nejsou pro jednotlivé mykobakteriální druhy specifické. Lze je také zaměnit s nálezy při plísňových infekcích či sarkoidóze. Stejně tak nelze pomocí zobrazovacích metod s jistotou rozlišit kolonizaci zjizvené či bronchiektatické plicní tkáně od aktivní infekce vedoucí k těmto změnám (Agrawal 2014; Bártů 2009).

2.6.3 Laboratorní průkaz přítomnosti mykobakterií v klinickém materiálu

Laboratorní diagnostika mykobakterií se opírá o metody přímého průkazu mykobakterií v klinickém materiálu. Skládá se především z kombinace **metod určení fenotypu** - mikroskopie, kultivace a případně stanovení biochemických vlastností zkoumaných mikrobů. Pro přesnou identifikaci mykobakteriálního druhu se používají **genetické metody**. Nepřímý průkaz mykobakterií serologickými testy se běžně neprovádí (Chemlal a Portaels 2003; Tille 2014).

2.6.3.1 Odběr vzorku

Nejběžněji odebíraným materiálem pro diagnostiku mykobakterií je **sputum**, které se odebírá ráno nalačno bez předchozí hygieny dutiny ústní a bez výplachu úst vodovodní vodou (možnost kontaminace vzorku mykobakteriemi přítomnými ve vodě). Pokud se pacientovi nedaří vykašlávat dostatečné množství sputa, před odběrem se podávají expektorancia nebo se provádí inhalace 15% roztoku NaCl ve sterilní destilované vodě. Takto získaný materiál se označuje jako **indukované sputum**. Pro diagnostiku infekcí postihujících respirační systém lze také použít vzorek **bronchoalveolární laváže** a ve výjimečných případech také **laryngeální výtěr** na 3 laryngeální sondy. Výtěžnost tohoto výtěru je však malá a je zde velké riziko nákazy odebírajícího personálu.

Dále se pro diagnostiku mykobakterií používají vzorky **moče, likvoru**, pleurální i jiné **punktáty, žaludeční laváž**, vzorky **stolice, výtěry z ran, odběry hnisu**, případně **krev** na hemokultivaci v případě diseminací a septických stavů (Tille 2014; Mahon, Lehman a Manuselis 2011).

2.6.3.2 Dekontaminace, homogenizace a neutralizace vzorků

Příprava vzorku klinického materiálu zahrnuje dekontaminaci, homogenizaci a koncentraci materiálu. Tyto postupy jsou předpokladem co největší výtěžnosti následného

mikroskopického, kultivačního i molekulárně genetického vyšetření (Čermák a kol. 2014; Mahon, Lehman a Manuselis 2011).

Dekontaminace se provádí za účelem potlačení růstu průvodní mikroflóry ve většině vyšetřovaných vzorků (vzorky z respiračního traktu, trávicího traktu, výtěry z ran apod.). V případě kultivace pomalu rostoucích mykobakterií by ostatní přítomné mikroorganismy mohly postupně přerůst vyšetřované mykobakterie, čímž by byl zásadně ovlivněn výsledek vyšetření. Pro dekontaminaci se používají anorganické kyseliny, hydroxid sodný či roztoky NaOH s detergentními prostředky, vůči kterým jsou mykobakterie relativně rezistentní, zatímco ostatní mikroorganismy jejich účinku podléhají (Čermák a kol. 2014; Mahon, Lehman a Manuselis 2011).

Po přidavku dekontaminačního činidla následuje homogenizace, tedy proces, kdy dochází k protřepávání vzorku s dekontaminačním činidlem. Tím dojde k dokonalému promísení směsi. Speciálním případem jsou velké vzorky tkání a pevné vzorky. Tyto materiály je zapotřebí před dekontaminací a homogenizací rozmělnit na menší kousky ve sterilní třecí misce, nebo pomocí homogenizátoru (Čermák a kol. 2014).

Účinek dekontaminačního činidla se zastavuje přidavkem neutralizačního činidla - používá se slabý roztok HCl nebo fosfátový pufr o pH 6,8.

Sterilně odebraný klinický materiál, jako je likvor či punkáty, může být vyšetřován i bez předchozí dekontaminace. Provádí se pouze centrifugace ke zkoncentrování vzorku (Čermák a kol. 2014; Tille 2014).

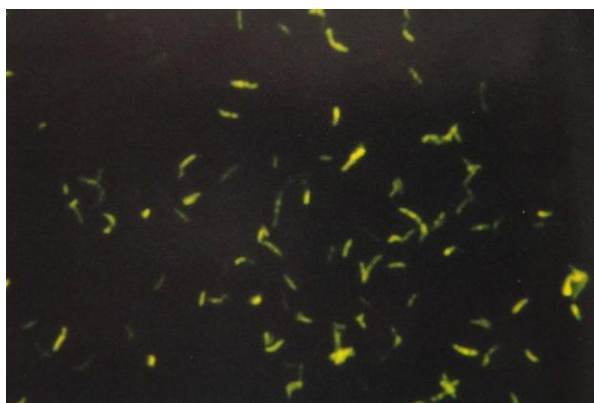
2.6.3.3 Mikroskopie

Pro mikroskopické vyšetření v rámci diagnostiky mykobakterií se zhotovují fixované barvené preparáty.

Běžně se používá **barvení dle Ziehl-Neelsena**, kdy se fixovaný preparát nejprve barví roztokem karbolfuchsinu a dobarvuje se roztokem methylenové modři nebo malachitové zeleně. Tak dojde k probarvení i tak silně acidorezistentní buněčné stěny, jakou mají mykobakterie. Pozitivní nález se jeví jako růžové tyčinky (mykobakterie) na modrém či zeleném pozadí. Výsledky se odečítají na základě prohlédnutí 50 zorných polí (Votava a kol. 2010).

Modifikací Ziehl-Neelsenova barvení je **metoda dle Kinyouna**. Tato metoda umožňuje barvení preparátu za studena, čehož je dosaženo zvýšením koncentrace bazického fuchsinu a fenolu v barvicím roztoku karbolfuchsinu (Tille 2014).

Další možností je **barvení fluorochromy** (obr. 5). Používá se zde roztok fluorescenčních barviv auraminu a rhodaminu a k dobarvení pozadí roztok kyselého fuchsinu. Takto zhotovený preparát je připravený k hodnocení ve fluorescenčním mikroskopu, kde jsou vidět žlutě zbarvené mykobakterie na tmavě červeném pozadí (Tille 2014; Votava a kol. 2010).



Obr. 5. *M. avium-intracellulare* barvené fluorochromem auraminem (upraveno podle de la Maza a kol. 2004)

Tyto barvicí metody slouží pouze ke zjištění, zda jsou v klinickém materiálu přítomny acidorezistentní bakterie. Na základě mikroskopického vyšetření nelze určit definitivní diagnózu. Vždy je potřeba výsledek posoudit v souvislosti s klinickým stavem pacienta a s výsledky dalších vyšetření. Na základě všech těchto informací rozhodne indikující klinik o prozatímní léčbě nemocného, dokud není diagnóza definitivně potvrzena (kolektiv autorů 1998; Čermák a kol. 2014).

2.6.3.4 Kultivace

2.6.3.4.1 Kultivační půdy

Pro izolaci mykobakterií se používá kombinace pevných a tekutých kultivačních půd s obsahem různých látek. Výhodou tekutých půd je, že zde mykobakteria vyrostou rychleji.

Kolonie vykultivované na pevných půdách však lze použít k bližší identifikaci na základě jejich morfologie, rychlosti růstu, tvorby pigmentu a dalších vlastností. Na pevných půdách lze také rozpoznat přítomnost více mykobakteriálních druhů, což tekuté půdy neumožňují (Griffith a kol. 2007; Tille 2014).

Z pevných kultivačních médií se nejčastěji používá selektivní **Löwenstein-Jensenova půda (LJ)**, obsahující živný agar, některé soli, asparagin, glycerin, škrob, roztřepaná vejce a malachitovou zeleň, která dává mediu zelenou barvu. Zkumavky jsou plněny šikmo. Společně s LJ půdou se využívá šikmo plněná vaječná **půda dle Ogawy**. V ní je asparagin nahrazen glutamátem (Čermák a kol. 2014; Griffith a kol. 2007; Votava a kol. 2010).

Z tekutých médií je pro růst mykobakterií vhodná **Šulova půda** s obsahem L-alaninu, glycerinu, kaseinového hydrolyzátu a bovinního séra (Votava a kol. 2010).

Alternativou Šulovy půdy je **Baničova půda**. Složení těchto dvou půd se mírně liší - Baničova půda obsahuje L-asparagin místo L-alaninu, naopak neobsahuje glycerin a kaseinový hydrolyzát (Krawiecová 2007; kolektiv autorů 1998).

Další možností jsou pevné půdy **Middlebrook 7H10** nebo **7H11** a tekutá půda **Middlebrook 7H9** pro urychlenou kultivaci v automatických metabolických kultivačních systémech (Griffith a kol. 2007).

Kolonie pomalu rostoucích NTM na pevných půdách vyrostou za 2 až 8 týdnů, zatímco kolonie rychle rostoucích NTM (např. *M. fortuitum*, *M. chelonae*) se objevují do 7 dnů (Tille 2014). Teplotní optimum se pohybuje mezi 30 až 45 °C (Sedláček 2007).

2.6.3.4.2 Kultivace v automatických systémech

Klasické kultivační metody lze doplnit kultivací v automatických kultivačních systémech, jelikož ty jsou schopny prokázat živé mykobakterie ve vzorku za kratší dobu a umožňují tak co nejrychlejší sdělení výsledků klinikovi. Při těchto metodách se monitorují změny v uzavřeném systému kultivační nádoby, které jsou důsledkem metabolismu žijících mykobakterií ve vzorku. V současné době se využívají dva principy, a to detekce poklesu koncentrace kyslíku (systémy Bactec) nebo kolorimetrická detekce nárůstu koncentrace oxidu uhličitého (systém BacT/ALERT) v kultivační lahvičce v důsledku metabolismu mykobakterií (Ptáková 2011; Tang a Stratton 2006).

2.6.3.5 Identifikace netuberkulózních mykobakterií

Léčebné možnosti mykobakteriálních infekcí jsou závislé na citlivosti mikroba k antimikrobiálním látkám, která je však druhově specifická. Proto ve většině případů nestačí ve vzorku určit přítomnost bakterií rodu *Mycobacterium*, ale je nezbytná i druhová identifikace (Griffith a kol. 2007). Lze ji provést z izolovaného čistého kmene, a v některých případech také přímo z klinického materiálu (Watterson a Drobniewski 2000).

V případě identifikace čistého izolátu je prvním krokem mikroskopické ověření, zda jde o acidorezistentní tyčinky. Dalším krokem bývají tradiční metody identifikace mykobakterií založené na **sledování rychlosti růstu**, **produkci pigmentu**, na určení **biochemických vlastností** a na **analýze lipidů** buněčné stěny mykobakterií. Tyto metody jsou však s ohledem na počet mykobakteriálních druhů a potřebu co nejdříve zvolit efektivní terapii považovány za zdlouhavé a mnohdy neprůkazné (Tille 2014). Proto se v současné době stávají nepostradatelnými **molekulárně-biologické metody** (Chemlal a Portaels 2003).

2.6.3.5.1 Testy biochemické aktivity

Mykobakteriální izoláty je možné identifikovat na základě panelu biochemických testů, avšak tato metoda je v současnosti oproti jiným způsobům identifikace považována za zdlouhavou, a to z důvodu pomalého metabolismu většiny mykobakteriálních druhů. Další nevýhodou je, že pomocí testování biochemické aktivity nelze spolehlivě rozlišit všechny druhy a už vůbec ne poddruhy v rámci mykobakteriálních komplexů. Získané výsledky jsou brány spíše jako orientační. Testy jsou založeny na průkazu tvorby charakteristických enzymů, produktů metabolismu a průkazu inhibice růstu po expozici selektivnímu inhibitoru (Mahon, Lehman a Manuselis 2011, American Thoracic Society 1997).

2.6.3.5.1.1 Niacinový test

Mezi základní testy metabolické aktivity patří niacinový test. Vedlejším produktem metabolismu mykobakterií je niacin. Většina mykobakteriálních druhů je schopna volný niacin dále metabolizovat, výjimku tvoří *M. tuberculosis*, *M. simiae* a některé izoláty *M. marinum* a *M. bovis* BCG (Mahon, Lehman a Manuselis 2011). Tyto druhy neexprimují enzym potřebný k jeho další přeměně, a v důsledku toho volný niacin akumulují

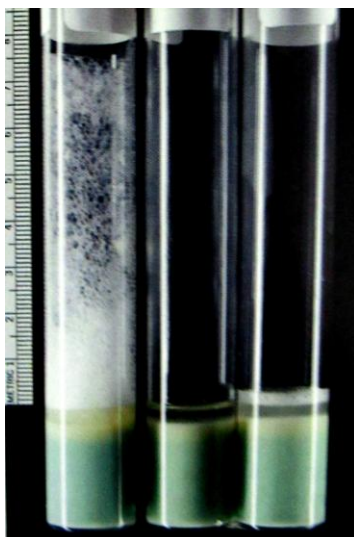
v kultivačním médiu. Test je založen na reakci niacinu s alkalizovaným bromkyanem v přítomnosti aminu za vzniku žluté sloučeniny u druhů s blokovanou přeměnou niacinu (de la Maza a kol. 2004).

2.6.3.5.1.2 Test redukce nitrátů

Dalším možným biochemickým testem v mykobakteriální diagnostice je test redukce nitrátů. Využívá schopnosti určitých druhů produkovat enzym nitrátoreduktázu, která katalyzuje redukci dusičnanů na dusitany. Pozitivní výsledek ve formě červeně zbarvené sloučeniny je charakteristický pro *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. fortuitum*. Test lze provádět ve zkumavkách, nebo pomocí diagnostických stripů (Mahon, Lehman a Manuselis 2011; Tille 2014).

2.6.3.5.1.3 Katalázový test

Většina mykobakterií, vyjma *M. gastri* a některých izoniazid-rezistentních kmenů *M. tuberculosis*, produkuje enzym katalázu, která katalyzuje štěpení peroxidu vodíku na molekulu vody a kyslíku. Vznik molekul kyslíku je provázen tvorbou bublin. Na základě výšky bublinového sloupce ve zkumavce lze mykobakterie rozlišit na ty, které tvoří sloupec vyšší nebo nižší než 45 mm (obr. 6). Dále je možné mykobakterie dělit podle termostability jimi exprimované katalázy po zahřívání kultury na teplotu 68 °C po dobu 20 minut (Ribón 2012; Tille 2014).



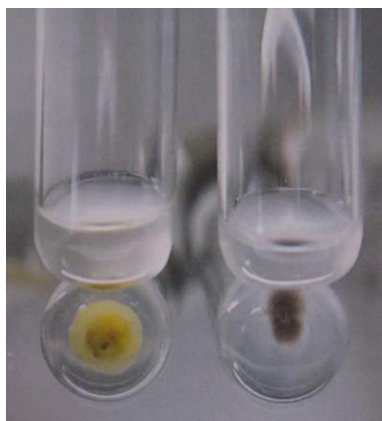
Obr. 6. Katalázový test - vlevo *M. fortuitum* (sloupec bublin vyšší než 45 mm), uprostřed neinokulovaná kontrolní zkumavka, vpravo *M. avium* (sloupec bublin vysoký méně než 45 mm) (upraveno podle de la Maza a kol. 2004)

2.6.3.5.1.4 Arylsulfatázový test

Pro identifikaci pomalu, ale i rychle rostoucích mykobakterií slouží také různé modifikace arylsulfatázového testu. Arylsulfatáza je enzym přeměňující fenolftalein disulfát na fenolftalein a další soli. Rychlost, s jakou k reakci dochází, je druhově odlišná (Tille 2014). Při identifikaci rychle rostoucích druhů jako *M. chelonae* nebo *M. fortuitum* může být nápomocný třídní test, zatímco pro pomalu rostoucí mykobakterie (např. *M. marinum*, *M. szulgai*) je vhodná čtrnáctidenní modifikace testu (de la Maza a kol. 2004).

2.6.3.5.1.5 Test redukce telluridu draselného

Test redukce telluridu draselného spočívá v rozdílné schopnosti jednotlivých druhů redukovat bezbarvý tellurid draselný na černě metalický tellurový precipitát (de la Maza a kol. 2004). Na základě tohoto testu lze rozeznat členy komplexu *M. avium-intracellulare*, redukující tellurid během 3-4 dnů, od ostatních nonchromogenních druhů. Stejně tak rychle rostoucí druhy jsou schopny přeměnit tellurid draselný za 3 dny (Mahon, Lehman a Manuselis 2011; Tille 2014).



Obr. 7. Test redukce telluridu - vlevo negativní reakce *M. gordonae*, vpravo pozitivní reakce organismů MAI komplexu (upraveno podle de la Maza a kol. 2004)

2.6.3.5.2 Chromatografické metody

Chromatografické techniky se mohou uplatnit v analýze mykolových kyselin zabudovaných v buněčné stěně mykobakterií. Využitelnost těchto technik v mykobakteriologii je založena na předpokladu, že složení a délka těchto sloučenin je pro jednotlivé druhy specifická. V současnosti se provádí zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (Mahon, Lehman a Manuselis 2011). Chromatografie mykolových kyselin je vhodná především pro identifikaci pomalu rostoucích druhů mykobakterií, identifikace rychle rostoucích druhů tímto způsobem je obtížná (Griffith a kol. 2007).

2.6.3.5.3 Molekulárně-biologické metody

V posledních dvou dekáдах byly vyvinuty mnohé molekulárně-biologické metody pro přímou detekci a identifikaci mykobakterií. Tyto metody výrazně zkracují délku vyšetření z týdnů na hodiny až dny (Chemlal a Portaels 2003; van Ingen 2013).

Jednou z možností je využití druhově specifických DNA sond (AccuProbe; Gen-Probe Inc, San Diego, California, United States of America), které jsou dostupné pro většinu klinicky významných mykobakteriálních druhů jako *M. tuberculosis* komplex, MAI komplex,

M. kansasii a *M. goodii* (Watterson a Drobniewski 2000). Metoda spočívá v hybridizaci luminoforem značené DNA sondy s ribosomální RNA příslušného mykobakteriálního druhu (Chemlal a Portaels 2003). Test může být použit k identifikaci kmene izolovaného na pevné či v tekuté půdě, lze ho však provést také s primokulturami (Tille 2014). Další možností je amplifikace úseku mezi geny pro 16S a 23S rRNA pomocí PCR s následnou hybridizací amplikonů se specifickou sondou (INNO-LIPA Mycobacteria; Innogenetics, Ghent, Belgium) (Chemlal a Portaels 2003).

Dále se z technik molekulární biologie využívá amplifikace vybraného úseku mykobakteriální DNA polymerázovou řetězovou reakcí za použití druhové specifických primerů s následnou restrikční analýzou nebo sekvenací tohoto úseku (Chemlal a Portaels 2003). Tyto metody bývají zaměřeny nejčastěji na gen pro 16S rRNA, na gen pro mykobakteriální heat shock protein hsp65, rpoB gen nebo na úsek DNA mezi geny pro 16S a 23S rRNA (Tille 2014; van Ingen 2013).

2.6.3.6 Testy citlivosti na antituberkulóza

Zatímco u každého nově izolovaného kmene komplexu *M. tuberculosis* se léková citlivost testuje vždy, u NTM se stanovení provádí jen v indikovaných případech (Čermák a kol. 2014). Mezi základní testovaná antituberkulóza patří streptomycin, isoniazid, rifampicin, etambutol a pyrazinamid (Votava a kol. 2010).

Metodou volby ke stanovení citlivosti je v současné době určení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) širšího spektra antimikrobiálních látek v mikrotitrační destičce. Lze však použít také tzv. proporční metodu dle Canettiho nebo metody využívající kultivace v automatických kultivačních systémech (American Thoracic Society 1997; Bednář a kol. 1996; Čermák a kol. 2014).

3 Praktická část

3.1 Cíl práce

Cílem této práce je:

1. Osvojit si metody používané v rámci laboratorní diagnostiky mykobakteriálních infekcí.
2. Provést sběr a vyhodnocení údajů o vyšetření (informace o pohlaví, věku a diagnóze vyšetřovaného, pracovišti žádajícím o vyšetření, dále o typu analyzovaného materiálu).
3. Vyhodnotit podíl pozitivních pacientů z celkového množství vyšetřených.
4. Vyhodnotit zastoupení jednotlivých mykobakteriálních druhů u pozitivních pacientů.

3.2 Hypotézy

Hypotéza č. 1: Ověřit, zda se u imunokompromitovaných jedinců netuberkulózní mykobakteria vyskytují častěji než u imunokompetentních osob.

Hypotéza č. 2: Ověřit, zda existuje souvislost mezi rizikem rozvoje mykobakteriálních infekcí a věkem pacienta.

3.3 Soubor pacientů

V období od 1. 1. 2015 do 31. 12. 2015 bylo na Mikrobiologický ústav Fakultní nemocnice u sv. Anny s požadavkem na mykobakteriální vyšetření zasláno celkem 2393 vzorků od 1092 pacientů ve věku od 2 do 98 let. Popisovaný soubor tvořilo 635 mužů a 457 žen. Vzorky byly odebírány nejčastěji na pracovištích FN Brno a FNUSA, ale i v dalších zdravotnických zařízeních v Brně a mimo něj.

Pozitivní nálezy byly do analýzy zahrnuty po průkazu rodu *Mycobacterium* na MIÚ FNUSA a po confirmaci výsledků v Laboratoři pro diagnostiku mykobakterií Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí programu Microsoft Office Excel 2007.

3.4 Použitý materiál a metody

3.4.1 Reagencie, materiál a přístrojové vybavení

Mikroskopie

Chemikálie:

- karbolfuchsin (přípraven ve varně MIÚ FNUSA)
- kyselý alkohol
- 1% vodný roztok methylenové modři
- sterilní destilovaná voda
- sterilní fyziologický roztok

Další materiál:

- odmaštěná podložní skla
- diamantová popisovací tužka
- mikrobiologická klička
- skleněné kyvety

- nosič preparátů
- filtrační papír
- stopky

Dekontaminace, homogenizace a neutralizace

Chemikálie:

- 1M roztok NaOH
- 1M HCl
- 2M NaOH
- mykobaktericidní dezinfekce
- destilovaná voda
- fosfátový pufr
- fyziologický roztok

Další materiál:

- nádoby se šroubovacím uzávěrem Dispolab, 50 ml
- nádoby se šroubovacím uzávěrem Dispolab, 20 ml
- sterilní Pasteurovy pipety
- nastavitelná mikropipeta Eppendorf, 100 - 1000 μ l
- špejle
- sterilní skleněné kuličky

- centrifuga Hettich-Universal 320
- termostat temperovaný na teplotu 37 °C

BacT/ALERT[®] MB

Komerční set vyráběný firmou bioMérieux, Inc pro urychlenou kultivaci v automatickém detekčním systému BacT/ALERT 3D se skládá z těchto reagensů:

- sterilní kultivační lahvička **BacT/ALERT[®] MB** (obr. 8) s 29 ml média a vnitřním čidlem pro detekci CO₂. Médium obsahovalo Middlebrook 7H9 Broth (0,47% hmotnost/objem), pankreatickou natráveninu kaseinu (0,1% hmotnost/objem), glycerol (1,0% hmotnost/objem) a SPS (0,025% hmotnost/objem) v purifikované vodě.



Obr. 8. Kultivační lahvička BacT/ALERT[®] MB před inokulací

- lahvička obsahující 5,5 ml **MB/BacT[®] Enrichment Fluid** s obsahem: hovězí sérový albumin (14,5% hmotnost/objem), chlorid sodný (2,5% hmotnost/objem), kyselina olejová (0,174% hmotnost/objem) a saponin (4,4% hmotnost/objem) v purifikované vodě (BioMérieux c2008).

Z dalších materiálů byly použity:

- sterilní stříkačky a jehly
- sterilní Pasteurovy pipety
- mykobaktericidní dezinfekční prostředek
- gázy
- tampony namočené v alkoholu

- mikrobiální detekční systém BacT/ALERT 3D, dodávaný firmou bioMérieux, Inc
- termostat temperovaný na 37 °C, CO₂ atmosféra
- laminární box pro práci se vzorky

BD BBL™ MGIT™

Set BD BBL™ MGIT™ dodávaný firmou Becton, Dickinson and Company se skládá z:

- zkumavky **BD BBL™ MGIT™** o objemu 4 ml s obsahem 110 µl fluorescenčního ukazatele (pentahydrát chloridu tris-4,7-difeny-1,10-fenantrolinruthenatého v základu ze silikonové pryže) a 4 ml živné půdy (pozměněný základ média Middlebrook 7H9 Broth a pepton kaseinu) v atmosféře 10% CO₂.

- lahvičky **BD BBL™ MGIT™ OADC Enrichment** obsahující 15 ml obohacení OADC Middlebrook ve složení:

albumin z hovězího séra	50,0 g/l
dextróza	20,0 g/l
kataláza	0,03 g/l
kyselina olejová	0,6 g/l

- lahvičky **BD BBL™ MGIT™ PANTA™** obsahující lyofilizovanou antibiotickou směs:

Polymyxin B	6000 jednotek
Amfotericin B	600 µg
Kyselina nalidixová	2400 µg
Trimetoprim	600 µg
Azlocillin	600 µg

(Becton, Dickinson and Company 2002)

Další použitý materiál:

- nastavitelná mikropipeta Eppendorf, 100 – 1000 µl
- vyměnitelné špičky

- BACTEC™ MicroMGIT™ Fluorescence Reader
- laminární box pro práci se vzorky
- termostat temperovaný na 37 °C

Kultivace ve zkumavkách

- PEVNÉ PŮDY: Löwenstein-Jensenova půda, Ogawova půda
 - TEKUTÁ PŮDA: Šulova půda
 - sterilní Pasteurovy pipety
 - uzavíratelné plastové zkumavky
 - gumičky
 - stojánky
-
- termostat temperovaný na 37 °C

3.4.2 Postupy a hodnocení

3.4.2.1 Příjem klinického materiálu

Při příjmu materiálu bylo zkontrolováno, zda je vzorek odebrán v dostatečném množství do vhodné odběrové nádoby, zda je nádoba řádně označená a zda údaje na ní odpovídají informacím na přiložené žádance. Pokud byly tyto podmínky splněny, materiál byl přijat a požadavek na vyšetření byl zadán do LIS.

V laboratoři bylo k odběrové nádobě se vzorkem a k žádance přiděleno laboratorní identifikační číslo s čárovým kódem. Stejně označení bylo přiřazeno také ke zkumavkám a lahvičkám pro kultivaci.

3.4.2.2 Mikroskopický průkaz

Mikroskopickému vyšetření se podrobují všechny vzorky vyjma výtěrů, stěrů a močí.

Příprava mikroskopického preparátu

Na vymezenou plochu řádně popsaného podložního skla byla pomocí mikrobiologické kličky nanesena malá kapka suspenze vzorku, poté byla rozetřena a nechala se zaschnout. Před barvením byly preparáty po dobu 4-5 minut fixovány v kyvetě s roztokem čistého methanolu. K barvení byla použita modifikovaná Ziehl-Neelsenova metoda (= metoda dle Kinyouna), sestávající z kroků:

- 1) barvení roztokem **karbolfuchsinu** po 5 min
- 2) oplach mírným proudem tekoucí vody
- 3) odbarvení roztokem **kyselého alkoholu** po 2-3 min
- 4) oplach mírným proudem tekoucí vody
- 5) dobarvení roztokem **methylenové modři** po 1 min
- 6) oplach mírným proudem tekoucí vody (Čermák a kol. 2014)

Po obarvení se preparáty nechaly osušit při pokojové teplotě. Takto zhotovené preparáty byly vyšetřeny pomocí světelného mikroskopu za použití imerzního objektivu, zvětšujícího 100×, a imerzního oleje (Čermák a kol. 2014).

Odečet výsledků

Při vyšetření mikroskopického preparátu se prohlíží 50 zorných polí po celé ploše preparátu. Hodnocení mikroskopických preparátů barvených metodou dle Kinyouna znázorňuje tabulka č. 2 (Čermák a kol. 2014; kolektiv autorů 1998).

Tab. 2. Hodnocení mikroskopického nálezu (Čermák a kol. 2014)

0	ART nenalezeny
1 - 9	ojedinělé ART
+	10 – 20 ART
++	21 – 100 ART
+++	více než 100 ART

3.4.2.3 Kultivace

3.4.2.3.1 Příprava materiálu před inokulací

Po zhotovení barvených fixovaných preparátů bylo zapotřebí zaslané vzorky upravit pro následnou inokulaci na kultivační půdy. Kapalně materiály (sputum, BAT, punktáty, výpotky, moč a další) byly rovnou podrobeny dekontaminaci Petroffovou metodou.

Provedení Petroffovy dekontaminační metody:

- 1) K danému objemu materiálu byl přidán přibližně 2-3násobný objem 1M roztoku NaOH, zkumavka se uzavřela a protřepala. Husté materiály byly také promíchány špejlí, případně byly do zkumavek přidány sterilní skleněné kuličky, které při třepání napomáhaly homogenizaci směsi.
- 2) Zkumavky se vzorky a dekontaminačním činidlem byly vloženy na 12 minut do termostatu nastaveného na teplotu 37 °C. V průběhu byly 2× protřepány, aby došlo k dokonalejšímu promísení.
- 3) Takto homogenizované a vytemperované vzorky byly centrifugovány při 2500 g po dobu 20 minut.
- 4) Po centrifugaci byl supernatant ze zkumavek slit do dezinfekčního prostředku, určeného pro odpad, následně bylo do každé zkumavky se sedimentem přidáno 15 ml sterilní destilované vody a protřepalo se.
- 5) Zkumavky se centrifugovaly při 2500 g po 20 minut.
- 6) Opět byl odstraněn supernatant ze všech zkumavek a sediment byl resuspendován 2 ml sterilního fosfátového pufru.
- 7) Vytvořenou suspenzí bylo možné inokulovat kultivační média (kolektiv autorů 1998).

Kusový materiál (př. vzorky kůže, tkání) byl před dekontaminací ještě upraven rozetřením v třecí misce a obsah byl vymyt fyziologickým roztokem. Tyto materiály pak bylo možné dekontaminovat stejným způsobem jako ostatní vzorky (Čermák a kol. 2014).

Veškeré výtěry a stěry na tamponu byly dekontaminovány odlišným způsobem.

- 1) Do zkumavek s výtěry bylo přidáno 3,5 ml 1M HCl.
- 2) Uzavřené zkumavky byly inkubovány 20 minut při pokojové teplotě.
- 3) Do zkumavek bylo nepipetováno 1,75 ml 2M NaOH.
- 4) Uzavřené zkumavky byly inkubovány 10 minut při pokojové teplotě.
- 5) Po 10 minutách byla provedena inokulace obsahu zkumavek (upraveno dle kolektiv autorů 1998).

Kultivační vyšetření bylo prováděno v komerčně vyráběných kultivačních lahvičkách BacT/ALERT[®] MB vhodných pro inkubaci v automatickém systému BacT/ALERT 3D, případně ve zkumavkách BD BBL MGIT (obojí určeno pro urychlenou kultivaci). Souběžně s nimi byl materiál očkovan na povrch Löwenstein-Jensenovy půdy, Ogawovy půdy a tekuté Šulovy půdy.

3.4.2.3.2 Urychlená kultivace

BacT/ALERT[®] MB

V kultivačních lahvičkách BacT/ALERT[®] MB byly kultivovány všechny přijaté vzorky vyjma těch odebraných na tampón.

Postup přípravy kultivačních lahviček BacT/ALERT[®] MB a očkování probíhal podle schématu:

- 1) Bylo zkontrolováno, zda kultivační lahvičky BacT/ALERT[®] MB nebyly poškozeny či kontaminovány. Stejně tak byla zkontrolována lahvička s MB/BacT[®] Enrichment Fluid.
- 2) Zkontrolovalo se, zda odpovídá laboratorní identifikační číslo na zkumavce s dekontaminovanou suspenzí a na připravené kultivační lahvičce BacT/ALERT[®] MB.

- 3) Z kultivačních lahviček byl odstraněn plastový kryt. Gumové septum bylo dezinfikováno tamponem namočeným v alkoholu.
- 4) Z lahvičky obsahující MB/BacT[®] Enrichment Fluid byl taktéž odstraněn plastový kryt a gumové septum bylo dezinfikováno tamponem namočeným v alkoholu.
- 5) Sterilní stříkačkou byl nasát objem 0,5 ml obohacující tekutiny a tento objem byl za aseptických podmínek injikován do kultivační lahvičky. Krok byl opakován s každou kultivační lahvičkou.
- 6) Před inokulací vzorku byla kultivační lahvička dezinfikována tamponem namočeným v alkoholu.
- 7) Do kultivačních lahviček bylo injikováno vždy 0,5 ml dekontaminované suspenze ve sterilním fosfátovém pufru.
- 8) Po inokulaci byla septa všech lahviček otřena gázou namočenou v mykobaktericidním činidle.
- 9) Inokulované kultivační lahvičky byly vloženy do detekčního systému BacT/ALERT 3D, kde probíhala kultivace (Biomérieux c2008).

Hodnocení

Kultivace vzorků v detekčním systému BacT/ALERT 3D probíhala 6 týdnů, nebo do doby, než přístroj v konkrétní lahvičce zaznamenal pozitivitu. V případě positivity byla daná lahvička vytažena z automatu, ze vzorku byl zhotoven kontrolní nátěr barvený modifikovanou metodou dle Ziehl-Neelsena a dále byla provedena subkultivace na ART (Biomérieux c2008).

BD BBL[™] MGIT[™]

Komerčně dodávaný set BD BBL[™] MGIT[™] byl použit pro materiály odebírané na tampón (výtěry, stěry).

Příprava kultivačních zkumavek MGIT a inokulace materiálů probíhala v následujících krocích:

- 1) Do připravených kultivačních zkumavek MGIT, označených číslem vzorku, bylo za aseptických podmínek přidáno vždy 0,5 ml obohacujícího činidla MGIT OADC Enrichment.

- 2) Lyofilizovaná antibiotická směs v lahvičce MGIT PANTA byla aktivována přidavkem 3 ml sterilní destilované vody.
- 3) Do kultivačních zkumavek MGIT byl asepticky přidán vždy 0,1 ml aktivované antibiotické směsi MGIT PANTA.
- 4) Do takto připravených zkumavek MGIT bylo aplikováno 0,5 ml dekontaminované suspenze vzorku.
- 5) Kultivační zkumavky se uzavřely zátkou a byly důkladně protřepány.
Inokulované zkumavky byly vloženy do termostatu temperovaného na 37 °C (Becton, Dickinson and Company 2002).

Pozitivní a negativní kontrolní zkumavky

Princip této metody vyžaduje při hodnocení použití pozitivní a negativní kontrolní zkumavky. Tyto zkumavky slouží k interpretaci míry fluorescence.

Jako negativní kontrolní zkumavka může sloužit neotevřená a neinokulovaná kultivační zkumavka BD BBL™ MGIT™.

Pozitivní kontrolní zkumavka byla připravována podle návodu:

- 1) Z neinokulované zkumavky MGIT byla odstraněna živná půda.
- 2) Byl připraven 0,4% roztok sulfátu sodného, a to rozpuštěním 0,4 g pevného sulfátu sodného ve 100 ml sterilní destilované vody.
- 3) Do vyprázdněné zkumavky MGIT bylo odměřeno 5 ml roztoku sulfátu sodného.
- 4) Připravená pozitivní kontrolní zkumavka se před použitím nechala temperovat 1 hodinu při pokojové teplotě.
- 5) Zkumavka byla označena jako pozitivní vzorek a byla opatřena datem výroby.

Připravená pozitivní kontrolní zkumavka se při odečtu využívala opakovaně po dobu 4 týdnů. Po této době byla připravena nová kontrolní zkumavka (Becton, Dickinson and Company 2002).

Hodnocení

Odečet výsledků kultivace ve zkumavkách MGIT byl prováděn pomocí BACTEC™ MicroMGIT™ Fluorescence Reader (obr. 9), zařízení detekujícího nárůst fluorescence ve

zkumavce v důsledku citlivosti fluoroforu na snižující se koncentraci kyslíku během kultivace.



Obr. 9. BACTEC™ MicroMGIT™ Fluorescence Reader

Nejprve byly do přístroje vloženy postupně negativní a pozitivní kontrolní zkumavky. Ty sloužily jako srovnávací vzorky. Poté byly do readeru postupně vkládány kultivační zkumavky MGIT. Přístroj v jednotlivých zkumavkách vyhodnotil míru fluorescence přímo úměrnou množství namnožených mykobakterií. V případě silně pozitivních vzorků bylo možno v kultivačním médiu pouhým okem pozorovat nehomogenní zakalení, malé shluky nebo vločky (Becton, Dickinson and Company 2002).

Z pozitivních vzorků byl následně proveden kontrolní nátěr a subkultivace. Negativní zkumavky byly odečítány každý den po dobu 6 týdnů.

3.4.2.3.3 Klasická kultivace ve zkumavkách

Zbývající množství 1,5 ml dekontaminované suspenze vzorku bylo inokulováno do tekuté Šulovy půdy a na pevnou Löwenstein-Jensenovu a Ogawovu půdu (obr. 10).

Nejprve bylo Pasteurovou pipetou odebráno cca 0,5 ml suspenze a toto množství bylo inokulováno do zkumavek obsahujících Šulovu půdu. Takto naočkované zkumavky byly uzavřeny a poté důsledně protřepány.

Poté byl Pasteurovou pipetou odebrán zbývající objem dekontaminované suspenze (cca 1 ml) a ten byl aplikován na povrch pevných půd. Po uzavření plastovým uzávěrem byly zkumavky ještě několikrát kývavým pohybem nakláněny, aby došlo k rozlití inokula po celém povrchu půd.

Všechny zkumavky pro daný vzorek byly svázané gumičkou. Takto připravené svazky půd byly inkubovány v termostatu při 37 °C. Při práci se vzorky kůže a abscesy byl počet kultivačních půd zdvojnásoben a jedna sada byla inkubována při 30 °C. Tímto způsobem lze na půdách identifikovat i ty druhy, které snáze rostou při nižších teplotách (př. *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. haemophilum*) (Griffith, 2007; de la Maza a kol. 2004; Votava a kol. 2010).



Obr. 10. Kultivační půdy pro diagnostiku mykobakterií - zleva Löwenstein-Jensenova půda, půda dle Ogawy, Šulova půda

Hodnocení nárůstu kultur

Inkubace kultivačních půd trvá několik týdnů, protože pomalu rostoucí mykobakteria mají dlouhou generační dobu. Vyhodnocení kultivačního vyšetření se standardně provádí po 1, 3, 6 a 9 týdnech. Během týdne se na půdách objevují kolonie rychle rostoucích mykobakterií, případně jiné, kontaminující mikroorganismy. V případě kontaminace materiálu je nutno provést jeho nový odběr. Jestliže se po třech týdnech kultivace na půdách objeví mykobakteriální kolonie, sděluje se výsledek lékaři žádajícímu o vyšetření, získaný materiál

se podrobí mikroskopickému ověření a dalším metodám přesné identifikace. Zbývající půdy pokračují v inkubaci. Po šesti týdnech se provádí další vyhodnocení narostlých kultur a odesílají se pozitivní i negativní nálezy. Půdy, na kterých žádné kolonie nevyrostly, se nechávají kultivovat dále a po 9 týdnech od začátku kultivace se na žádající pracoviště odesílají pouze případné pozitivní výsledky. Poté kultivační vyšetření končí. Při podezření na infekci způsobenou *M. ulcerans* je vhodné kultivaci prodloužit na 12 týdnů (Votava a kol. 2010).

Pozitivní výsledky se kvantifikují podle schématu odpovídajícího kódování pro Informační systém bacilární tuberkulózy (tab. 3).

Tab. 3. Hodnocení pozitivních kultivačních nálezů (Čermák a kol. 2014)

1-9	ojedinělé kolonie, uvádí se jejich počet
+	10 – 20 kolonií
++	21 – 100 kolonií
+++	nepočítatelný počet kolonií, blanka na povrchu tekuté půdy, splývající růst na pevné půdě

Pro ověření přítomnosti ART se z pozitivních kultur zhotovují kontrolní nátěry. Tato kontrola se provádí v případě, že se u daného pacienta jedná o první pozitivní nález nebo je patrný netypický růst, tzn. amorfnií vatovitý sediment, homogenní růst, pigmentované kolonie v tekuté půdě, růst ve formě splývavého povlaku, růst v kondenzní vodě na vaječných půdách apod. (kolektiv autorů 1998)

3.4.2.4 Identifikace etiologického agens

V případě pozitivního mikroskopického nebo kultivačního vyšetření byla vyrostlá kultura zaslána na bližší identifikaci do Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, kde byly vzorky vyšetřeny kultivačně a genetickými metodami. Těmito metodami byla pozitivita potvrzena a byl identifikován konkrétní mykobakteriální druh. Na základě požadavku byla určena také citlivost na antituberkulotika.

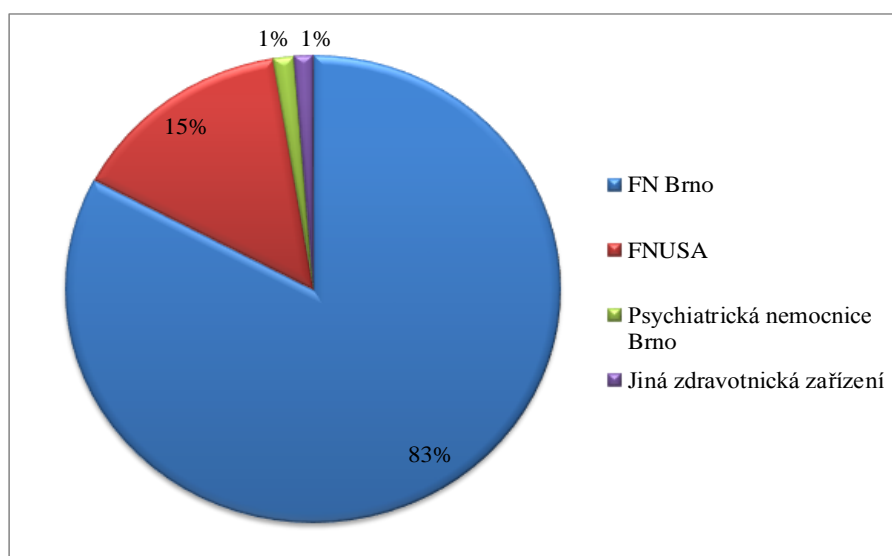
3.5 Výsledky

3.5.1 Zpracovávaná data

Ze žadanek přiložených k přijatým vzorkům klinického materiálu bylo sbíráno několik typů dat. Pro analýzu byly důležité údaje o pohlaví a věku pacienta, o diagnóze související s odběrem, dále údaje o odesílajícím pracovišti a typu vyšetřovaného materiálu.

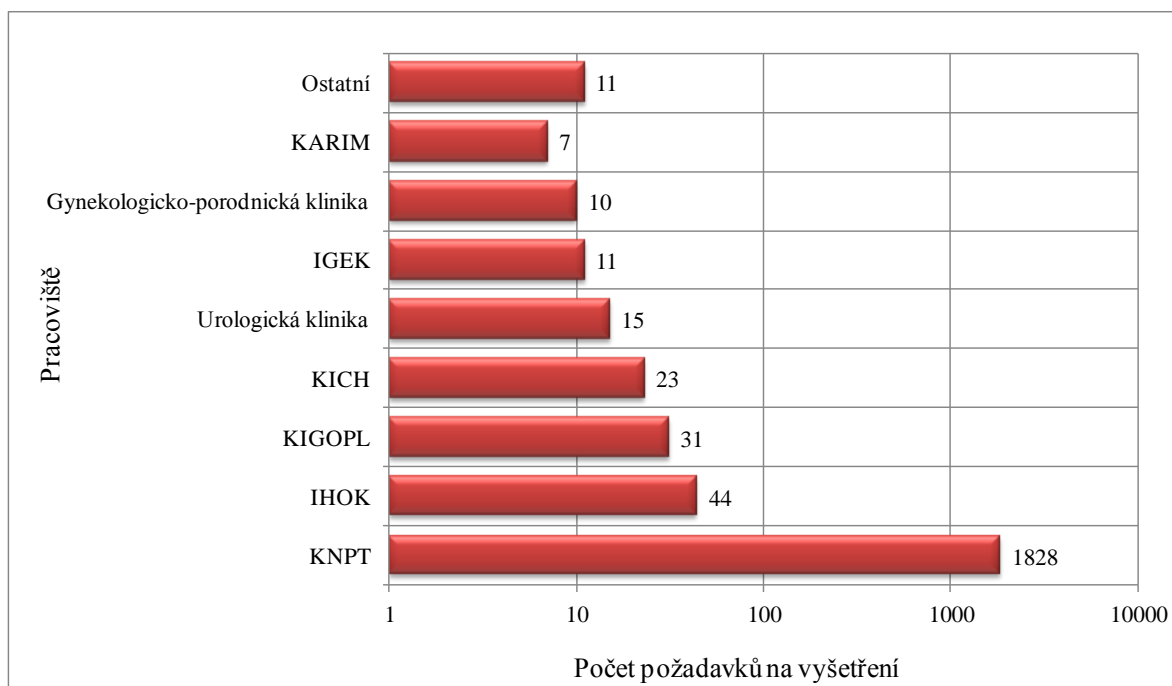
3.5.1.1 Odesílající pracoviště

Většina vzorků klinického materiálu byla zaslána ze zdravotnických zařízení se sídlem v Brně, a to především z pracovišť FN Brno a FNUSA. Z FN Brno bylo za rok 2015 zasláno 1980 vzorků (83 %), z FNUSA to bylo 352 vzorků (15 %). Psychiatrická nemocnice Brno žádala o mykobakteriální vyšetření 33 vzorků (1 %). Požadavky ostatních zdravotnických zařízení jsou shrnuty do skupiny „Jiná zdravotnická zařízení“ (graf 1). Jedná se o ta, ze kterých pocházelo jen malé množství vzorků (celkem 1 %): CKTCH Brno, Nemocnice Milosrdných bratří, Vazební věznice Brno, Vojenská nemocnice, MOÚ, SurGal Clinic Brno, Nemocnice Tišnov a Nemocnice Třebíč.



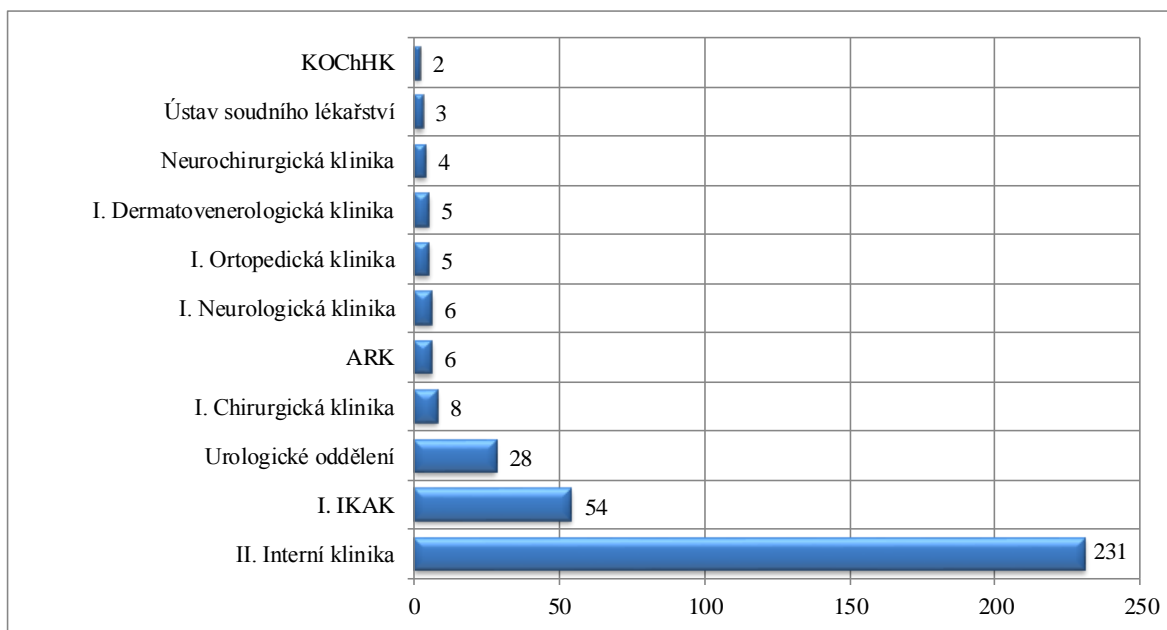
Graf 1. Procentuální zastoupení vzorků zaslanych z jednotlivých zdravotnických zařízení

Většina vzorků zaslaných z FN Brno pocházela z Kliniky nemocí plicních a tuberkulózy (1828 vzorků, 92 %). Dalších 44 vzorků (2 %) bylo dodáno Interní hematologickou a onkologickou klinikou; 31 vzorků (2 %) Klinikou interní, geriatrické a praktického lékařství a 23 vzorků (1 %) bylo zasláno z Kliniky infekčních chorob. O vyšetření žádala také Urologická klinika, IGEK, Gynekologicko-porodnická klinika a KARIM. Zbývající pracoviště požadovala mykobakteriální vyšetření výjimečně, a jsou proto shrnuta do kategorie „Ostatní“ - viz graf 2.



Graf 2. Zastoupení počtu požadavků na vyšetření jednotlivých pracovišť FN Brno

V rámci FNUSA byl materiál zasílán nejčastěji z II. interní kliniky (231 vzorků, 66 % z celkového počtu materiálů pocházejících z FNUSA), především však z pneumologické ambulance, která je její součástí. Dalších 54 vzorků (15 %) pocházelo z I. interní kardioangiologické kliniky, 28 vzorků (8 %) z Urologického oddělení. Část vzorků přicházela z I. chirurgické kliniky, Anesteziologicko-resuscitační kliniky, I. neurologické kliniky, I. ortopedické kliniky, I. dermatovenerologické kliniky, Neurochirurgické kliniky, dále z Ústavu soudního lékařství a z Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku (viz graf 3).

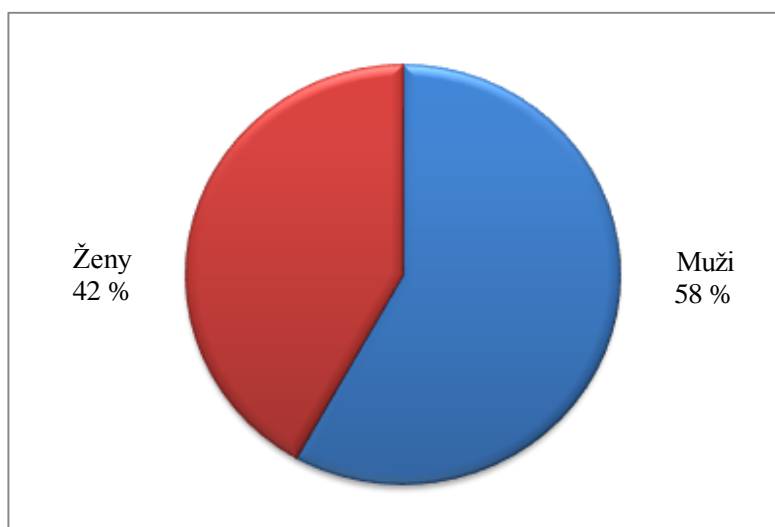


Graf 3. Zastoupení počtu požadavků na vyšetření jednotlivých pracovišť FNUSA

3.5.1.2 Údaje o pohlaví a věku pacientů

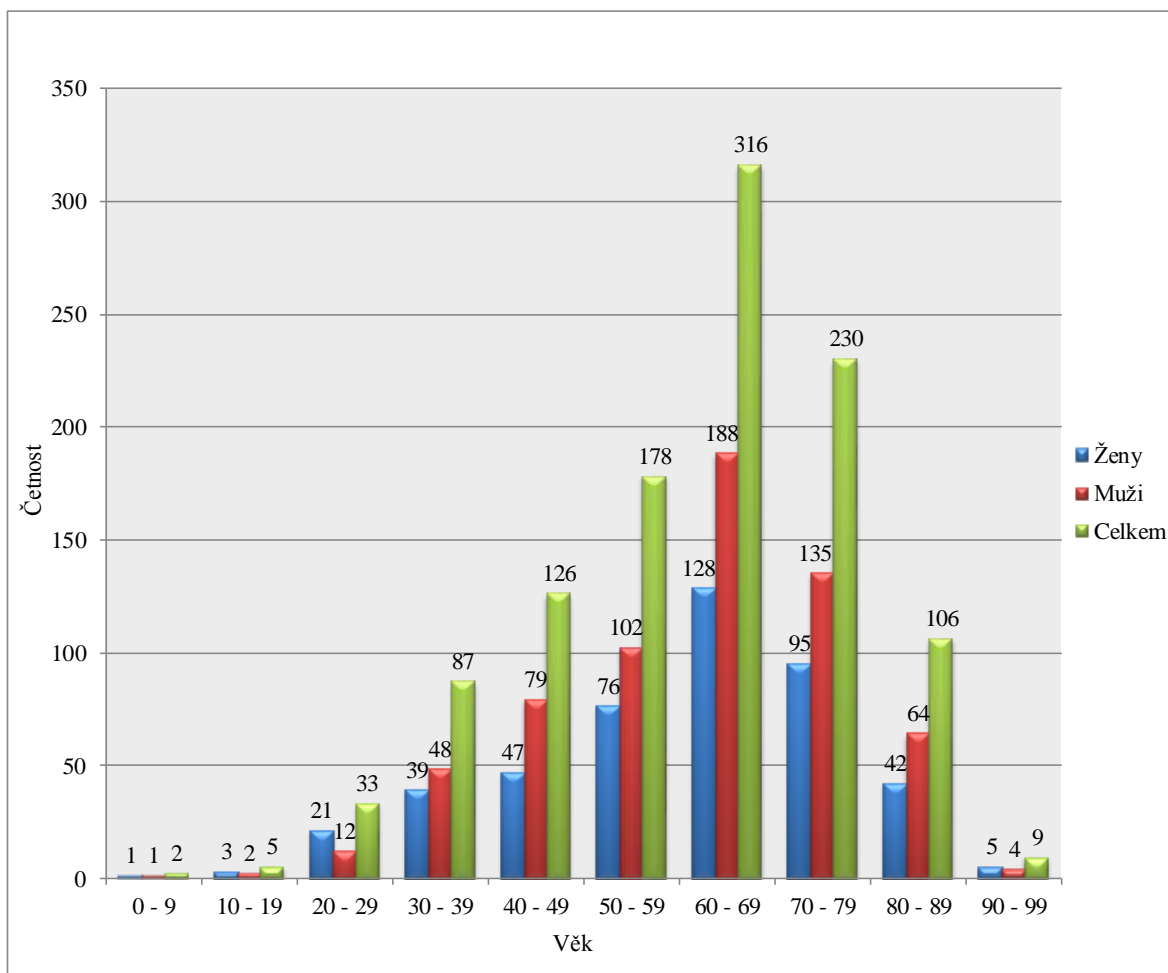
V r. 2015 bylo na MiÚ FNUSA vyšetřeno na přítomnost mykobakterií celkem 2393 materiálů od 1092 pacientů.

Z údajů o pohlaví pacientů bylo zjištěno, že soubor tvoří 635 mužů (58 %) a 457 žen (42 %) (viz graf 4).



Graf 4. Procento vyšetřených mužů a žen

Dalším zkoumaným parametrem byl věk pacientů. Ti byli rozděleni do věkových kategorií 0-9 let, 10-19 let, 20-29 let, 30-39 let, 40-49 let, 50-59 let, 60-69 let, 70-79 let, 80-89 let a 90-99 let. Četnost vyšetřovaných pacientů v jednotlivých věkových kategoriích popisuje graf 5.



Graf 5. Histogram věkové demografie vyšetřovaných pacientů

3.5.1.3 Diagnózy pacientů

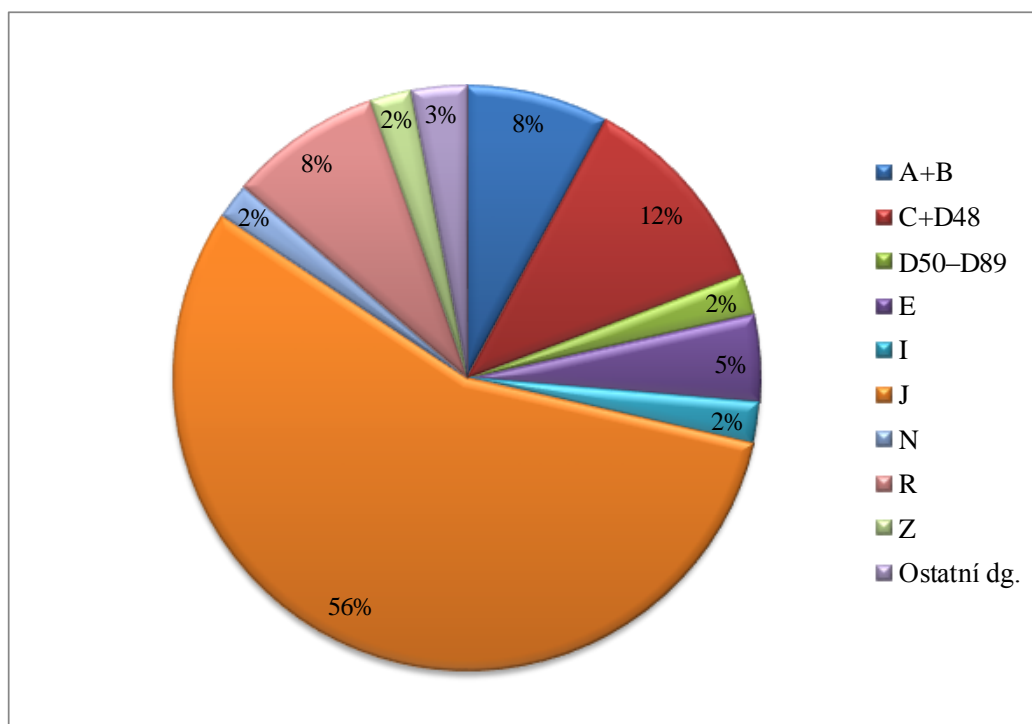
Dalším zkoumaným parametrem byly diagnózy pacientů v době odběru (související s prováděnou mykobakteriální diagnostikou). Ty byly na žádankách zaznamenávány formou kódů, které jsou dle systému Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10) rozděleny do skupin odpovídajících převážně lokalizaci onemocnění, případně typu tkáně.

Seznam skupin diagnóz a jim přidělených kódů (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2013):

I.	A00–B99	Některé infekční a parazitární nemoci
II.	C00–D48	Novotvary
III.	D50–D89	Nemoci krve, krevtovorných orgánů a některé poruchy týkající se mechanismu imunity
IV.	E00–E90	Nemoci endokrinní, výživy a přeměny látek
V.	F00–F99	Poruchy duševní a poruchy chování
VI.	G00–G99	Nemoci nervové soustavy
VII.	H00–H59	Nemoci oka a očních adnex
VIII.	H60–H95	Nemoci ucha a bradavkového výběžku
IX.	I00–I99	Nemoci oběhové soustavy
X.	J00–J99	Nemoci dýchací soustavy
XI.	K00–K93	Nemoci trávicí soustavy
XII.	L00–L99	Nemoci kůže a podkožního vaziva
XIII.	M00–M99	Nemoci svalové a kosterní soustavy a pojivové tkáně
XIV.	N00–N99	Nemoci močové a pohlavní soustavy
XV.	O00–O99	Těhotenství, porod a šestinedělí
XVI.	P00–P96	Některé stavy vzniklé v perinatálním období
XVII.	Q00–Q99	Vrozené vady, deformace a chromozomální abnormality
XVIII.	R00–R99	Příznaky, znaky a abnormální klinické a laboratorní nálezy nezařazené jinde
XIX.	S00–T98	Poranění, otravy a některé jiné následky vnějších příčin
XX.	V01–Y98	Vnější příčiny nemocnosti a úmrtnosti
XXI.	Z00–Z99	Faktory ovlivňující zdravotní stav a kontakt se zdravotnickými službami
XXII.	U00–U99	Kódy pro speciální účely

U popisovaného souboru pacientů se nevyskytovaly diagnózy kategorie H, P, Q, V-Y ani U. Psychiatrické diagnózy (kategorie F) byly z analýzy vyřazeny jakožto nesouvisející s rozvojem mykobakteriálních infekcí.

Zastoupení jednotlivých písmenných kategorií diagnóz bylo vztahováno k počtu vyšetření, ne k počtu vyšetřených pacientů. Mnozí z nich byli vyšetřováni opakovaně a v průběhu diagnostického nebo léčebného procesu byla jejich diagnóza zpřesněna, případně změněna. Nejvíce bylo pacientů s diagnózami kategorie J, tedy s nemocemi dýchací soustavy (1334, tedy 56 % z celku). V pořadí druhou nejpočetnější skupinu tvořily osoby s nádorovým onemocněním (274 jedinců, 11 %) - diagnózy kategorie C a D00 až D48. Zbývající kategorie byly zastoupeny každá v množství $\leq 8\%$ z celkového počtu 2393 žádank. Diagnózy kategorií G, K, L, M, O a S+T byly z důvodu zanedbatelného množství zařazeny do skupiny „Ostatní dg.“ (graf 6).

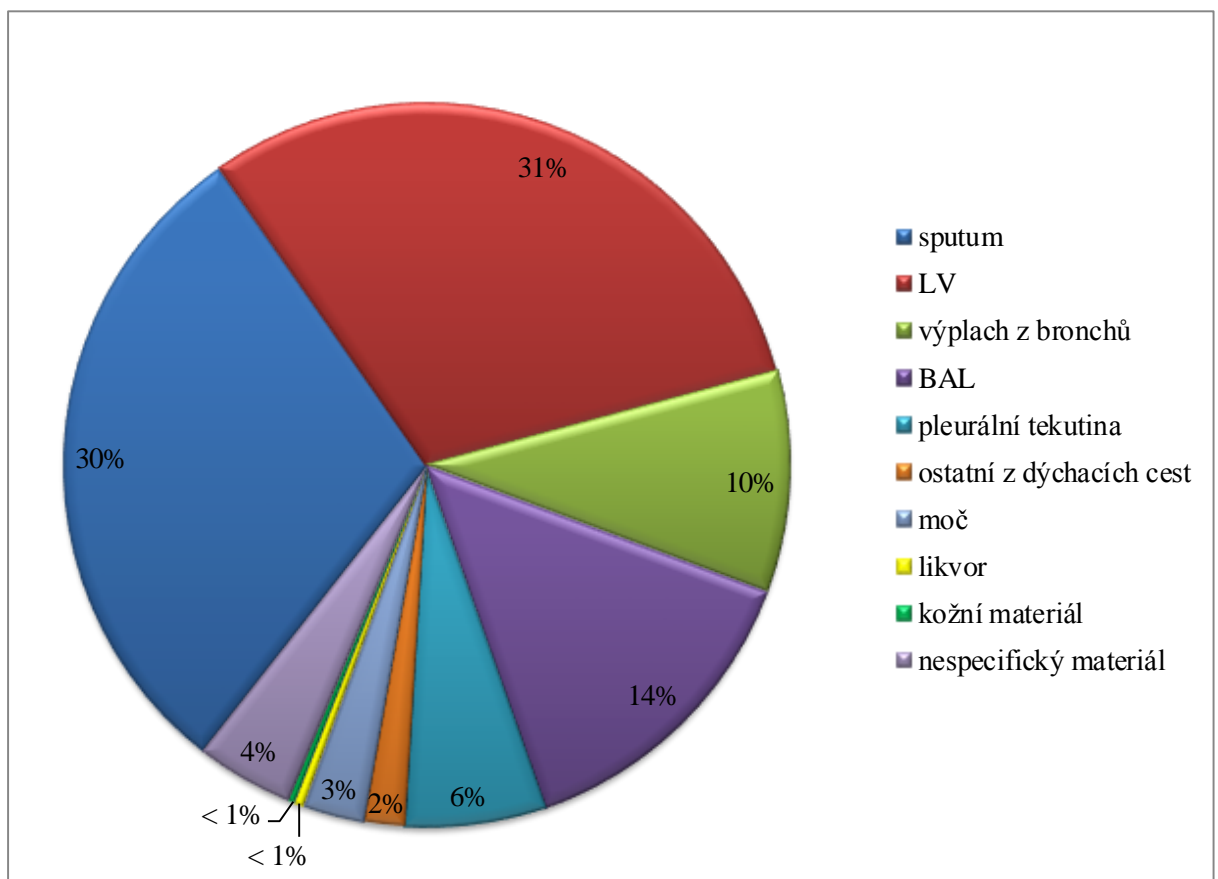


Graf 6. Procentuální zastoupení diagnóz tříděných dle MKN-10 klasifikace

3.5.1.4 Vyšetřované vzorky

Většina vyšetřovaných vzorků (v počtu 2207, procentuálně 93 %) za rok 2015 pocházela z dýchací soustavy - 712 vzorků sputa (30 %), 730 laryngeálních výtěrů (31 %), 236 výplachů z bronchů (10 %), 336 bronchoalveolárních laváží (14 %), 149 vzorků pleurální tekutiny (6 %) a 44 vzorků (2 %) zařazených do kategorie „ostatní z dýchacích cest“. Mezi ostatní materiály z dýchacích cest byly zařazeny především výtěry z krku, tracheální aspiráty a materiál z kanyl zavedených do dýchacích cest.

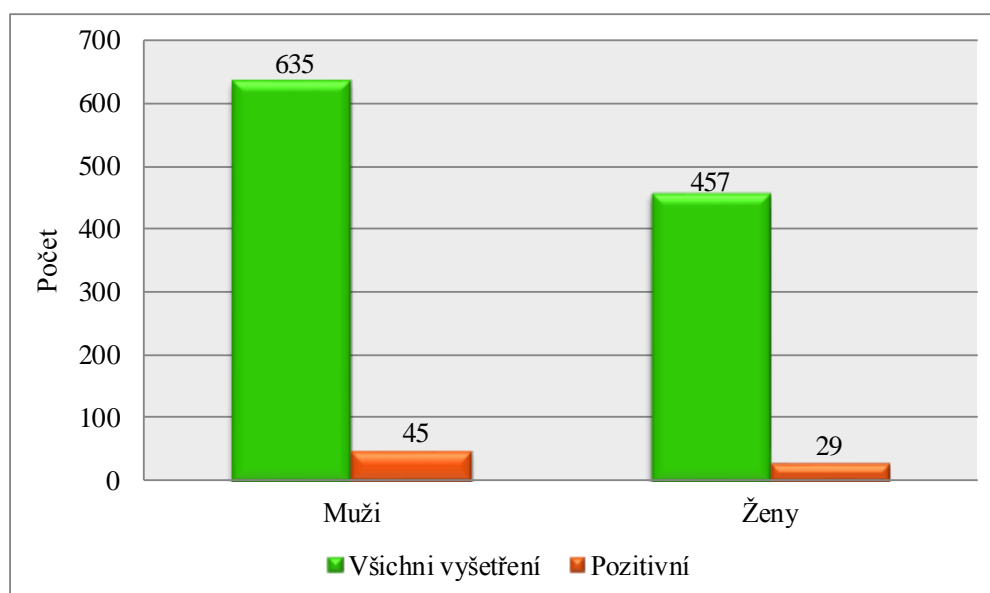
Analyzováno bylo také 65 vzorků moči (3 %), 10 vzorků likvoru (< 1 %) a 7 vzorků kůže (< 1 %). Zbývajících 104 vzorků (4 %) bylo zařazeno do kategorie nespecifikovaný materiál. Jednalo se o blíže neurčené punktáty, výpotky, dále sporadicky vyšetřované materiály jako stolice, obsah empyémů, stěry z ran a peroperačně odebrané vzorky tkání (graf 7).



Graf 7. Procentuální zastoupení typů vyšetřovaných vzorků

3.5.1.5 Pozitivní výsledky

Počet pozitivních pacientů byl významně nižší než počet vyšetřených. Z celkového počtu 1092 pacientů byla přítomnost mykobakterií (včetně *M. tuberculosis*) prokázána u 74 z nich (6,8 % pozitivních jedinců). Z 635 vyšetřených mužů bylo pozitivních 45 (7,1 %), z 457 vyšetřených žen bylo pozitivních 29 (6,3 %) - viz graf 8. Počet pozitivních vzorků však byl 76. Počet pozitivních jedinců a pozitivních vzorků nesouhlasí, protože 2 pacienti byli v průběhu roku vyšetřeni dvakrát. Z toho u jedné pacientky byl při každém vyšetření zjištěn jiný druh - při prvním to bylo *M. tuberculosis* a při druhém *M. kansasii*. U druhého pacienta bylo při obou vyšetřeních identifikováno *M. tuberculosis* – časový odstup těchto vyšetření byl však krátký, takže se dá předpokládat, že se jednalo o stejného původce.

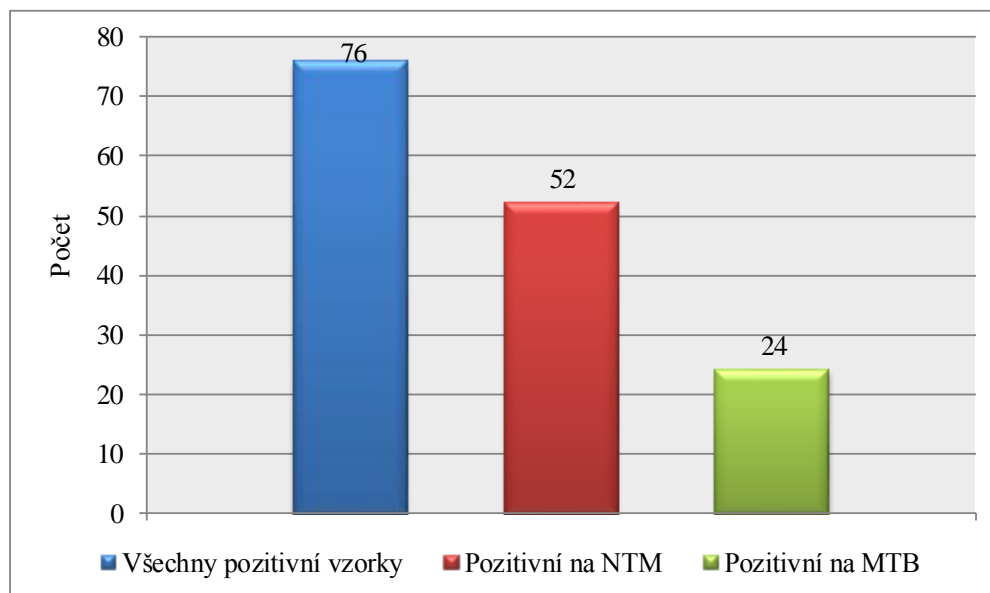


Graf 8. Porovnání počtu vyšetřených vs. pozitivních mužů a žen

Netuberkulózní mykobakteria jako původci onemocnění byla prokázána v 52 vzorcích (4,8 % vyšetřených případů, 68,4 % pozitivních případů) - z toho 28 vzorků bylo od mužů a 24 vzorků od žen. U zbývajících 24 případů bylo identifikováno *M. tuberculosis* (MTB), viz graf 9.

V průběhu diagnostiky byly jako pozitivní označeny ještě vzorky dalších 4 pacientů, avšak výsledky nejsou zahrnuty do analýzy. U třech pacientů byl ve Zdravotním ústavu se sídlem

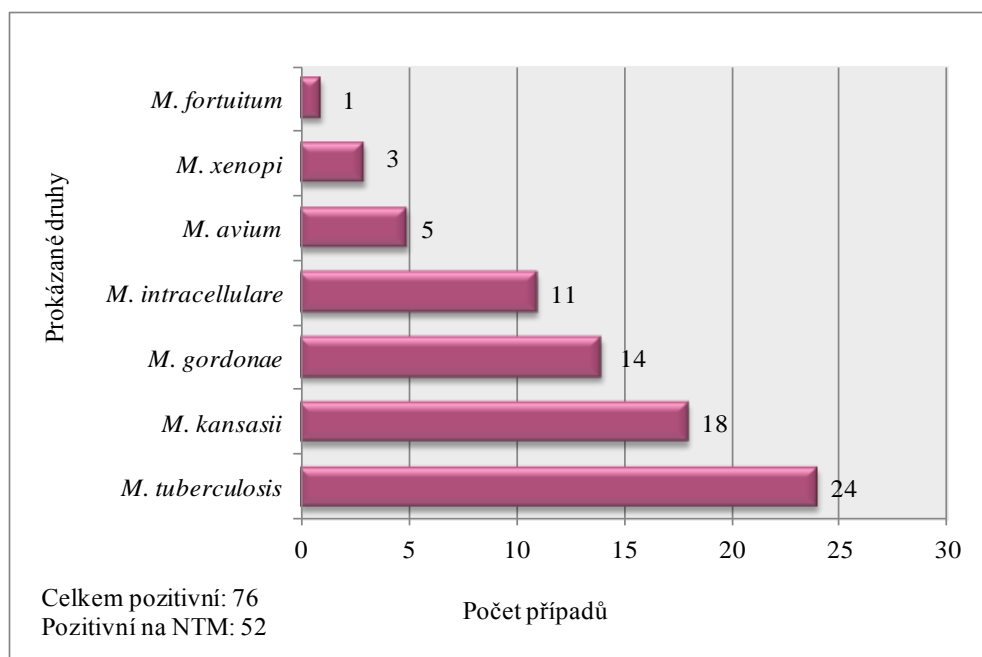
v Ostravě výsledek uzavřen jako kontaminace a u jednoho pacienta z důvodu jeho úmrtí dále neprobíhalo dourčení mykobakteriálního druhu.



Graf 9. Porovnání počtu všech pozitivních vzorků, pozitivních na netuberkulózní mykobakteria a na *M. tuberculosis*

3.5.1.6 Identifikované mykobakteriální druhy

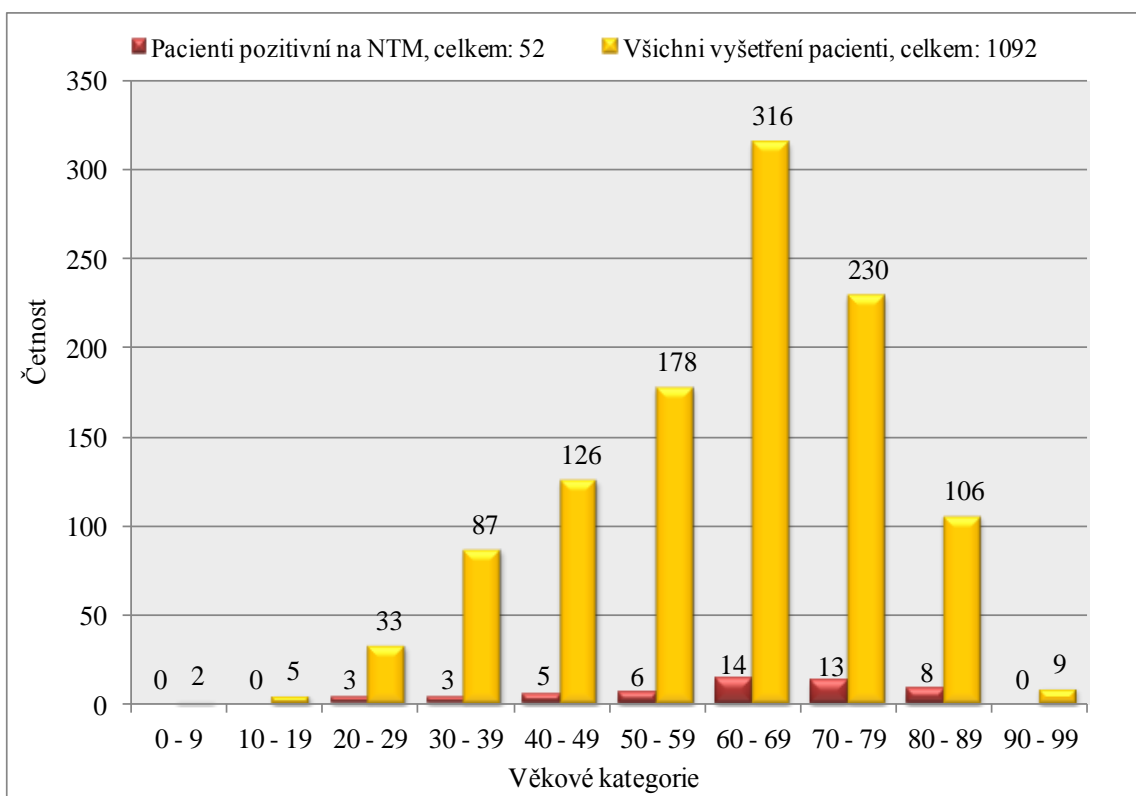
Z jednotlivých druhů NTM bylo nejčastěji prokázáno *M. kansasii*, které bylo potvrzeno u 18 případů. U 14 pacientů bylo jako původce onemocnění identifikováno *M. gordonae*, u 11 bylo příčinou *M. intracellulare*. *M. avium* bylo potvrzeno u 5 případů, zatímco *M. xenopi* u 3 jedinců. Pouze u 1 vyšetřovaného byl prokázán druh *M. fortuitum*. Pro srovnání je uveden také počet případů (24), u kterých bylo v roce 2015 prokázáno *M. tuberculosis* (graf 10).



Graf 10. Počet pozitivních nálezů jednotlivých mykobakteriálních druhů

3.5.1.7 Věk a diagnózy pozitivních pacientů

Graf 11 znázorňuje absolutní četnost jedinců dané věkové kategorie pozitivních na netuberkulózní mykobakteria (červeně) a absolutní četnost jedinců vyšetřených na známky mykobakteriální infekce (žlutě).

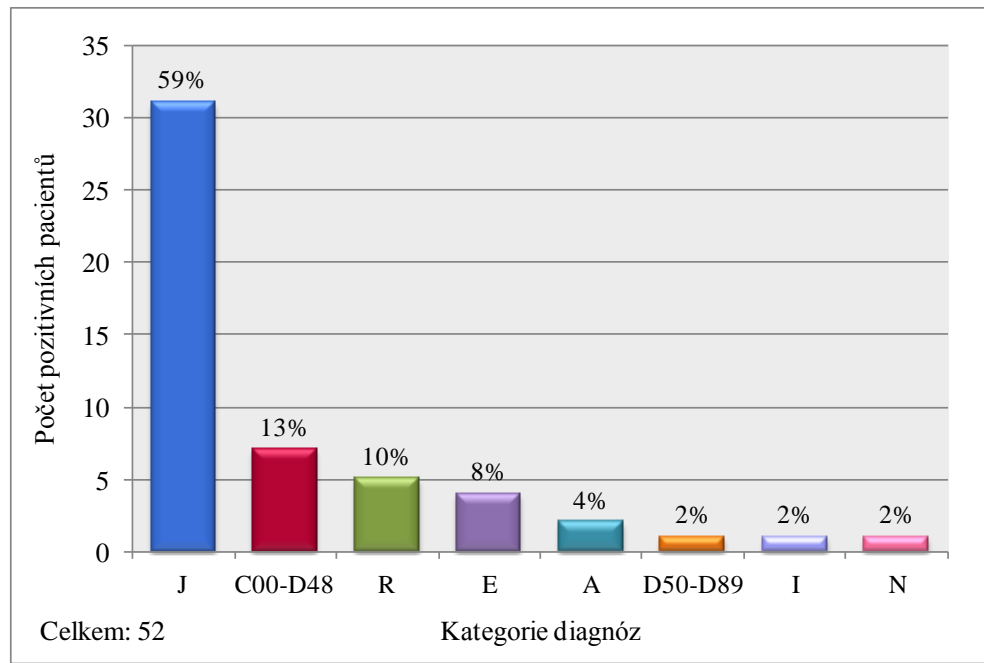


Graf 11. Porovnání počtu vyšetřených a pozitivních pacientů v jednotlivých věkových kategoriích

Pokud přepočítáme počet pozitivních nálezů na počet pacientů v jednotlivých kategoriích (vyjádřeno v %), pak nejvíc pozitivních jedinců je ve věkové kategorii 20-29 let: $(3/33) \cdot 100 \% = 9,09 \%$. Následuje kategorie 80-89 let: $(8/106) \cdot 100 \% = 7,55 \%$. V kategorii 20-29 let je však poměrně malý počet vzorků. Tato skutečnost zkresluje výsledek v porovnání s jinými věkovými kategoriemi.

Mezi pacienty ve věku 30-39 let bylo zaznamenáno 3,45 % pozitivních, v kategorii 40-49 let 3,97 % pozitivních. Ve skupině 50-59 let se procentuální zastoupení pozitivních snížilo na 3,37 %, avšak v kategorii 60-69 let (4,43 %) a 70-79 let (5,65 %) se procento pozitivních opět zvýšilo. Naopak v kategoriích 0-9 let, 10-19 let a 90-99 let nebyl pozitivní žádný pacient.

Z celkového počtu 52 vzorků patřilo 31 z nich pacientům s nemocemi dýchací soustavy (J), dalších 7 pacientů, jejichž vzorky byly vyšetřeny, mělo v době odběru diagnózu nádorového onemocnění (C00-D48), 5 uvádělo nespecifické příznaky (R) a 4 vyšetření měli v anamnéze cystickou fibrózu (E84), viz graf 12.



Graf 12. Četnost diagnóz u pozitivních pacientů

3.6 Diskuze

V roce 2015 bylo na MiÚ FNUSA v rámci mykobakteriální diagnostiky vyšetřeno 2393 vzorků klinického materiálu od 1092 pacientů. Procentuální zastoupení vyšetřených mužů bylo 58 % a vyšetřených žen 42 %.

Z grafu 1 vyplývá, že nejvíce vzorků za rok 2015 bylo zasláno z pracovišť FN Brno (83 %) a Fakultní nemocnice u sv. Anny (15 %).

Graf 2 ukazuje, že z pracovišť FN Brno o mykobakteriální vyšetření nejčastěji žádala Klinika nemocí plicních a tuberkulózy (92 %) a Interní hematologická a onkologická klinika (2 %).

Z pracovišť FNUSA nejvíce požadavků pocházelo z II. interní kliniky (66 %) - zejména z plicní ambulance. Dalších 15 % bylo zasláno z I. interní kardiologické kliniky.

Vysoké procentuální zastoupení požadavků z KNPT, IHOK a II. interní kliniky (plicní ambulance) souvisí s procentuálním zastoupením diagnóz pacientů v době odběru klinického materiálu. Graf 6 ukazuje, že 56 % pacientů mělo v době odběru obtíže spojené s dýchacím traktem a 12 % pacientů mělo nádorové onemocnění, z toho 75 % novotvarů se týkalo dýchací soustavy a nitrohruďných orgánů a 15 % nádorů mělo původ v mízní, krevtovorné či příbuzné tkáni.

Obdobného procentuálního zastoupení si lze všimnout i ve skupině pozitivních případů. Více než polovina pozitivních osob (59 %) měla v době odběru diagnostikováno onemocnění dýchacího traktu či nitrohruďných orgánů. Dalších 13 % tvořili onkologičtí pacienti - viz graf 12. To potvrzuje hypotézu č. 1. Na základě množství diagnóz souvisejících s dýchacím traktem a na základě množství vyšetřených vzorků z dýchacích cest lze usuzovat, že u pozitivních pacientů převažovala plicní forma mykobakterióz.

Informace o hlášených případech mykobakteriálních infekcí v ČR poskytuje také Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, který udává, že v roce 2014 bylo v Registru tuberkulózy hlášeno 133 onemocnění mykobakteriózou jinou než TBC. Plicní forma byla prokázána u 120 případů (114 nově vzniklých, 6 recidiv; celkem 90 %), ostatní formy u dalších 13 pacientů (12 nově vzniklých, 1 recidiva; celkem 10 %) (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2014).

Z grafu 5 lze odvodit, že nejčetnější vyšetřovanou skupinu tvořili pacienti ve věku 60 až 69 let. Jedná se o 316 vyšetřených.

Četnosti vyšetřených osob ve věkových kategoriích pod 60-69 let byly tím nižší, čím mladší daná skupina byla. Tomu také odpovídá počet vyšetřených pacientů ve věku 0-9 let. Jednalo se o dva pacienty - pacientku s onkologickou diagnózou (C40.2) a pacienta s akutní lymfadenitidou (L04.0).

Počet vyšetřených ve věkové kategorii 10-19 let bylo 5. Skupinu tvořila pacientka s nemocí perikardu (I23.0 a následně I31.9), pacientka s cystickou fibrózou (E84.0), pacientka podstupující specializované screeningové vyšetření (Z13.9) a dva muži - jeden s cystickou fibrózou (E84.0), druhý s maligním onemocněním (C81.1).

U pacientů ve věkových kategoriích 20-29 let, 30-39 let, 40-49 let a 50-59 let byl zaznamenán další přírůstek vyšetřených osob. Stejně tak byl zjištěn postupný nárůst případů s nemocemi dýchací soustavy (J) a s onkologickými diagnózami (C00-D48). Důležitou skupinou byli také jedinci s cystickou fibrózou ve skupinách 20-29 let a 30-39 let.

V kategoriích vyšších než 60-69 let lze naopak vyzorovat postupné snižování počtu vyšetřených jedinců. To pravděpodobně souvisí s faktem, že počet jedinců v tomto věku vlivem smrti přirozeně klesá.

Jedním ze závěrů této práce také je, že velká část pozitivních jedinců byly osoby ve věku 60 a více let. V našem případě se jednalo o 35 pacientů z celkového počtu 52 pozitivních na NTM (60-69 let: 14; 70-79 let: 13; 80-89 let: 8; 90-99 let: 0). Důvodem může být právě vysoký věk jakožto jeden z rizikových faktorů mykobakteriálních infekcí. U starších jedinců totiž v důsledku imunosenescence dochází ke změnám funkčnosti imunitních reakcí, jejichž výsledkem je zvýšená vnímavost vůči infekčním agens (Rychlíková a Šterzl 2004). Tito jedinci jsou navíc častěji polymorbidní a užívají různá farmaka, což jsou samy o sobě faktory oslabující imunitu (Bartoš a Koblížek 2010).

Z analýzy získaných dat bylo také zjištěno, že u žádného z vyšetřovaných pacientů mladších 20 let naopak NTM nebyla prokázána. U dětí a jedinců mladého věku sice bývá rizikovým faktorem mykobakterióz oslabení imunity v důsledku vrozených imunodeficiencí, cystické fibrózy, nádorových onemocnění apod. Na druhou stranu jsou tato onemocnění poměrně vzácná a roli hraje také skutečnost, že dětská populace nebývá zatížena faktory, jako je kouření a s tím související zdravotní potíže (zejména plicní změny) nebo třeba HIV infekce, resp. AIDS.

K podobným závěrům dospěla studie Panagiotou a kol. (2014), která se zabývala monitoringem mykobakterií v Athénách, hlavním městu Řecka, v letech 2007 až 2013. Tato studie uvádí, že z celkového počtu 120 pozitivních bylo 98 jedinců ve věku > 60 let a taktéž nebyl prokázán žádný pozitivní nález u pacientů mladších 20 let.

Z grafu 11 je patrné, že s přibývajícím věkem pacientů se zvyšoval počet těch, v jejichž vzorcích byla prokázána netuberkulózní mykobakteria. Tím byla potvrzena hypotéza č. 2.

Graf 8 ukazuje, že počet mykobakteriálních nálezů za rok 2015 nebyl vysoký. Z počtu 1092 vyšetřených pacientů bylo pozitivních 74 pacientů, z toho na NTM bylo pozitivních pouze 52 (4,8 % vyšetřených). Získané výsledky lze srovnat s prací Viviani a kol. (2016). Jejich studie uvádí, že z celkového počtu 13 593 vyšetřených pacientů bylo na NTM pozitivních 374 (2,7 %).

Z grafu 9 vyplývá, že v 52 případech (68,4 % pozitivních nálezů) byla prokázána přítomnost netuberkulózních mykobakterií a ve zbývajících 24 (31,6 %) bylo identifikováno *M. tuberculosis*. Bohužel nebylo možné nalézt pro srovnání evropskou či americkou vědeckou práci poskytující úplná data o výskytu netuberkulózních mykobakterií a současně *M. tuberculosis* ve studované populaci. Proto je uvedena studie Aliyu a kol. (2013) prováděná v období srpen 2010 až červenec 2011 na 1603 účastnících v Nigérii. Avšak i tato práce přináší cenné informace. Aliyu a kol. (2013) uvádí, že z celkového počtu 444 pozitivních nálezů bylo 69 (15,5 %) pozitivních na NTM, zbývajících 375 případů (84,5 %) bylo pozitivních na původce komplexu *M tuberculosis*.

Zajímavé je srovnání poměru MTB vs. NTM pozitivních výsledků. Zatímco v naší práci byla ve 2/3 pozitivních nálezů identifikována netuberkulózní mykobakteria a ve zbývajících 1/3 se jednalo o nálezy MTB komplexu, v práci Aliyu a kol. (2013) byla nastíněna zcela opačná situace - MTB komplex u více než 4/5 pozitivních, u méně než 1/5 vzorků netuberkulózní mykobakteria.

Důvodem nízkého počtu nálezů MTB ve vzorcích vyšetřovaných v laboratoři MiÚ FNUSA je pravděpodobně vysoká proočkovanost české populace. V roce 1953 bylo v tehdejší Československu zahájeno plošné očkování novorozenců proti tuberkulóze s následným přeočkováním v pozdějším věku, které bylo až na výjimky prováděno nepřetržitě do roku 2010. Očkování probíhalo i zpětně u starších ročníků (Petraš 2015). BCG vakcína také do určité míry chrání před infekcemi vyvolanými netuberkulózními mykobakteriemi. Účinnost vakcíny však není stoprocentní, což se projevuje manifestními nákazami zejména

u oslabených jedinců (Wallenfels 2013). Do budoucna také vyvstává otázka, zda ukončení očkování proti TBC v ČR bude mít vliv i na četnost výskytu NTM. Nárůst počtu NTM nálezů zase souvisí s rostoucím počtem imunokompromitovaných jedinců v posledních desetiletích, což je důsledek zvyšujícího se množství HIV pozitivních jedinců, osob s nádory a tím pádem osob léčených imunosupresivou či chemoradioterapií apod. (Greenwood a kol. c2007)

Vyšší počet pozitivních nálezů v nigerijské studii může být částečně dán vyšším počtem zúčastněných pacientů, ale velkou roli pravděpodobně hraje také odlišná socioekonomická situace obyvatel Nigérie oproti obyvatelům v ČR a zejména rozdílná vakcinační politika těchto dvou zemí (Ophori a kol. 2014).

Největší počet pozitivních nálezů byl zaznamenán u druhu *M. kansasii*. Tento druh byl identifikován v 18 pozitivních vzorcích (34 % izolovaných NTM), z toho bylo 17 materiálů z dýchacích cest a 1 nespecifický materiál. Podobně Hoefsloot a kol. (2013) uvádí, že ve střední Evropě (Slovensko, Polsko) bylo *M. kansasii* identifikováno v 35 % pozitivních vzorků, zatímco průměrné procentuální zastoupení *M. kansasii* v Evropě je 5 %. Lze předpokládat, že mykobakteriální distribuce v ČR bude obdobná situaci na Slovensku a v Polsku. ÚZIS ČR (2014) naopak uvádí počet nemocí vyvolaných druhem *M. kansasii* až na druhém místě (20 %), a to po infekcích MAC komplexu (51 %).

Druhým nejzastoupenějším byl komplex MAC (31 %). *M. intracellulare* bylo identifikováno v 11 vzorcích (21 %) – v 10 vzorcích z dýchacích cest a v dialyzátu (zařazen do nespecifického materiálu). *M. avium* bylo nalezeno v materiálech z dýchacího traktu 5 pacientů (10 %). Toto zastoupení odpovídá datům pro země střední Evropy, která jsou uvedena ve studii Hoefsloota a kol. (2013). Průměrná distribuce komplexu MAC v Evropě je však mnohonásobně vyšší (37 %) než zmíněná průměrná distribuce druhu *M. kansasii* (5 %) (Hoefsloot a kol. 2013). Podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (2014) bylo *M. avium-intracellulare* nejčastěji izolovaným mykobakteriálním druhem v ČR za rok 2014 – viz výše. Důvodem neshody výsledků může být to, že tato bakalářská práce se zabývala pouze pacienty v rámci Jihomoravského kraje, zatímco ÚZIS ČR uvádí výsledky průzkumu v celé republice. To znamená, že do jejich analýzy bylo zahrnuto více pacientů a z různých oblastí ČR.

Všechny vzorky, v nichž bylo prokázáno *M. gordonae* (14), pocházely z dýchacích cest. V případě tohoto mykobakteriálního druhu je však otázkou, zda se jedná o původce onemocnění. *M. gordonae* je totiž nejběžnější NTM kontaminantou v klinických vzorcích

a většinou je považováno za nepatogenní. Běžně se vyskytuje v laboratorním prostředí - ve vodovodních kohoutcích a tím pádem také ve vodovodní vodě, případně na jiných zdravotnických pomůckách. Tímto způsobem může dojít ke kontaminaci vzorků a kultur. Na druhou stranu u imunokompromitovaných jedinců může i málo virulentní *M. gordonae* vyvolat onemocnění. V takovém případě ošetřující lékař rozhoduje na základě kombinace výsledků laboratorního vyšetření, výsledků vyšetření zobrazovacími metodami a klinických projevů pacienta (Griffith a kol. 2007; Lessnau, Milanese a Talavera 1993; Votava a kol. 2010).

M. xenopi bylo izolováno ve 3 materiálech dýchacích cest, což je 6 % z prokázaných NTM. Podle Hoefsloota a kol. (2013) bylo podobné procentuální zastoupení zjištěno na Slovensku, kde bylo *M. xenopi* prokázáno ve 4 % případů s NTM infekcemi. Výskyt tohoto mykobakteriálního druhu v Polsku však byl výrazně odlišný (22 %). Taktéž průměrný výskyt *M. xenopi* v Evropě je podle zmíněné studie vyšší (14 %), než bylo zjištěno v rámci této bakalářské práce (Hoefsloot a kol. 2013).

V 1 pozitivním vzorku (z dýchacích cest) byl prokázán druh *M. fortuitum*, což jsou 2 % z počtu prokázaných NTM. Pro další země střední Evropy byla ve studii Hoefsloota a kol. (2013) uvedena pouze přibližná data: 0-5 % případů *M. fortuitum* na Slovensku a 5-10 % v Polsku. Celosvětový záchyt tohoto druhu ve vyšetřovaných vzorcích byl 7 % (Hoefsloot a kol. 2013).

3.7 Závěr

Mykobakteriální infekce jiné než tuberkulóza mají chronický charakter a pro jedince s oslabenou imunitou představují vážnou zdravotní komplikaci, která může vést až ke smrti. Tyto infekce jsou navíc obvykle provázeny nespecifickými příznaky, které se vyskytují u spousty dalších onemocnění, a tak ani lékař mnohdy nemusí pomýšlet na mykobakteriální původ onemocnění. Často právě nedostatečná informovanost lékařské obce o projevech a epidemiologii mykobakteriálních onemocnění zbytečně prodlužuje dobu, za kterou bude případný mykobakteriální původ infekce prokázán, a tím pádem oddaluje zahájení adekvátní terapie a ústup pacientových příznaků. Snižuje se tak možnost na úplné uzdravení postiženého.

Práce udává ucelený přehled o rizikových skupinách pacientů, o počtu pozitivních případů a četnosti prokázaných mykobakteriálních druhů na Brněnsku za rok 2015. Výsledky tedy mohou být přínosem pro lékaře přicházející běžně do kontaktu s rizikovými pacienty (KNPT FN Brno, plicní ambulance II. interní kliniky FNUSA), ale zejména pro lékaře ostatních odborností, aby se seznámili s danou problematikou a ve své běžné praxi vzali v úvahu i možnost mykobakteriálního původu infekcí.

Dále mohou být výsledky této práce přínosem pro epidemiology a vakcinology, kteří v české populaci sledují incidenci mykobakteriálních onemocnění po ukončení očkování proti TBC v roce 2010. Avšak až další roky ukážou, zda ukončení tohoto očkování skutečně povede i k nárůstu počtu těchto infekcí.

4 Použitá literatura

AGRAWAL, A. Imaging in nontuberculous mycobacterial lung infections. *Medscape* [online]. Indie: Teleradiology Solutions, 2014 [cit. 1. ledna 2016]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/358828-overview#showall>

ALIYU, G a kol. Prevalence of non-tuberculous mycobacterial infections among tuberculosis suspects in Nigeria. In: *PLoS ONE* [online]. 2013, roč. 8, č. 5, e63170 [cit. 2016-04-24]. doi:10.1371/journal.pone.0063170 Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063170>

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* [online]. 1997, roč. 156, č. 2, s. S1-S25 [cit. 10. března 2016]. Dostupné také z: <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/ajrccm.156.2.atsstatement>

AMOFAH, G. a kol. Buruli ulcer in Ghana: Results of a national case search. *Emerg Infect Dis.* [online]. 2002, roč. 8, č. 2, s. 167–170 [cit. 6. ledna 2016]. Dostupné také z: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/2/01-0119>

AREND, S. M. - VAN SOOLINGEN, D. - OTTENHOFF, T. H. M. Diagnostika a léčba plicních netuberkulózních mykobakteriálních infekcí. In: *Curr Opin Pulm Med* [online]. 2009, 6, s. 56–63 [cit. 1. ledna 2016]: Dostupné na: http://www.prolekare.cz/cop-clanek/diagnostika-a-lecba-plicnich-netuberkuloznich-mykobakterialnich-infekci-30785?confirm_rules=1

BARRY, C. E. a kol. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in Lipid Research* [online]. 1998, roč. 37, č. 2-3, s. 143-179 [cit. 18. prosince 2015]. DOI: 10.1016/S0163-7827(98)00008-3. ISSN 01637827. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782798000083>

BARTOŠ, V. - KOBLÍŽEK, V. Pneumonie u starších pacientů. *MEDICAL TRIBUNE CZ* [online]. Hradec Králové, 2010 [cit. 13. dubna 2016]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/17163-pneumonie-u-starsich-pacientu>

BÁRTŮ, V. *Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu netuberkulózních mykobakterií dospělých* [online]. Praha, 2009 [cit. 1. ledna 2016]. Dostupné také z: <http://www.pneumologie.cz/soubory/Doporuceny%20postup%20pro%20diagnostiku%20lecbu%20mykobakterioz%20dospelych%20-%201.doc>

BECTON, DICKINSON AND COMPANY. BD BBL™ MGIT™: Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment, PANTA™ Antibiotic Mixture. Příbalová informace. Bd.com, 2002 [cit. 21. dubna 2016]. Dostupné také z: <https://www.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-ManualMGIT.pdf>

BEDNÁŘ, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996.

BERÁNKOVÁ, T. *Tuberkulóza. Projevy a diagnostika na kosterních pozůstatcích člověka* [online]. Bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2010 [cit. 10. prosince 2015]. Dostupné také z: http://is.muni.cz/th/211421/prif_b/?lang=en

BIOMÉRIEUX. BacT/ALERT® MB. Příbalová informace. Tbevidence.org, c2008 [cit. 30. března 2016]. Dostupné také z: <http://tbevidence.org/documents/rescentre/sop/BacTALERT%20MB.pdf>

CAMINERO LUNA, J. A. *A tuberculosis guide for specialist physicians*. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2004 [cit. 10. března 2016]. ISBN 2-914365-13-6. Dostupné také z: http://www.tbrieder.org/publications/books_english/specialists_en.pdf

COVERT, T. C. a kol. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1999, roč. 65, č. 6, s. 2492-2496 [cit. 10. prosince 2015]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91367/>

CRELLIN, P. K. - LUO, C.-Y. - MORITA, Y. S. Metabolism of plasma membrane lipids in *Mycobacteria* and *Corynebacteria*. *Lipid Metabolism* [online]. InTech Open Access Publisher, 2013 [cit. 18. prosince 2015]. DOI: 10.5772/52781. Dostupné z

<http://www.intechopen.com/books/lipid-metabolism/metabolism-of-plasma-membrane-lipids-in-mycobacteria-and-corynebacteria>

ČERMÁK, P. a kol. *Národní standardní vyšetřovací postup 7: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění* [online]. Praha: Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP, 2014 [cit. 15. ledna 2016].

Dostupné také z: http://www.splm.cz/dokumenty/NSVP7_navrh1.pdf

DE LA MAZA, L. M. a kol. *Color atlas of medical bacteriology*. 1st ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2004. ISBN 1-55581-206-6

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic Names with standing in Nomenclature. *Mycobacterium* [online]. 2010 [cit. 3. prosince 2015]. Dostupné z <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>

FALKINHAM, J.O. III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* [online]. c1996, roč. 9, č. 2, s. 177–215 [cit. 10. prosince 2015]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172890/>

FALKINHAM, III, J.O. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2009, roč. 107, č. 2, s. 356-367 [cit. 10. prosince 2015]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x/full>

GREENWOOD, D. a kol. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169-365-0

GREENWOOD, D. a kol. *Medical microbiology: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. 17th ed. Edinburgh: Elsevier, c2007. ISBN 978-0-443-10209-7

GRIFFITH, D. E. a kol. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* [online].

2007, roč. 175, č. 4, s. 367–416 [cit. 28. ledna 2016]. Dostupné také z: http://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.200604-571ST#_i10

HOEFSLOOT, W. a kol. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *European Respiratory Journal* [online]. 2013, roč. 42, č. 6, s. 1604-1613 [cit. 20. dubna 2016]. ISSN 0903-1936. Dostupné z: <http://erj.ersjournals.com/content/42/6/1604.long>

CHEMLAL, K. - PORTAELS, F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis* [online]. c2003, roč. 16, č. 2, s. 77-83 [cit. 10. prosince 2015]. ISSN: 0951-7375. Dostupné z: <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.19.0a/ovidweb.cgi?QS2=434f4e1a73d37e8c54b7bccef7797d0c03a2c2d85327aeb5c2c326ed85909d183c09d7a9ac05c486615568a145b655f56a5181d7b34b9986333f006e7f2988081ab404b8204990e4ec51552bbd6607ae87f5fc7c686c2e627a05fcb33cac40ec5d483de7b7fc80534405bcd5d4fe60865e4d1f2eb360a958ba9f3b3d9c01538b1e704f744fe8bf1d13239b6f92c705f4cd960e503840511c75dd6c6229cbbde4cab21a7d013a4c6cd77641f98b32dca0c6328e075acc69b89856025c6159034bcb8845e9df964ad5eb285a88f0ee0e945a1a1f381d3cb73b19ca5627984cb091ff1d716093a1d49fb8f5ac16a6e197848d2ea675aacac839a2bc4e5128b0a5bbf1878ff7343def4d9fdc3c6b89d50d44a86fdbfacac9ffd7aa467ebab1d3a3fbedfb281e6194472b35c5cb857b352cc44e4700ef269cc1be29e98b30922a00955fb53be9f2e322c3dd2988be1e57f15c81de39297041581d2714ce0e739fd775571e9576aab8612973e2376a3a03aa5f546c60d63703924e27c6ed9372c967a161fe54df4f72a09b7f9e0740aea32a29>

KOLEKTIV AUTORŮ. *Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí*. Praha: Státní zdravotní ústav – Národní referenční laboratoř pro mykobakterie a firma Trios, s.r.o., 1998. ISBN 8070711094, 9788070711095

KRAWIECOVÁ, L. *Výběr a optimalizace metody pro laboratorní průkaz Mycobacterium tuberculosis H37 Rv ve vzorcích sputa*. Diplomová práce [online]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2007 [cit. 10. března 2016]. Dostupné také z: http://is.muni.cz/th/185034/prif_m/

LESSNAU, K.-D. - MILANESE, S. - TALAVERA, W. *Mycobacterium gordonae*: A treatable disease in HIV-positive patients. *Chest* [online]. 1993, roč. 104, č. 6, s. 1779-1785

[cit. 23. dubna 2016]. DOI: 10.1378/chest.104.6.1779. ISSN 00123692. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369215424511>

LINDEBOOM, J. A. a kol. Cervicofacial lymphadenitis in children caused by *Mycobacterium haemophilum*. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2005, roč. 41, č. 11, s. 1569-1575 [cit. 6. ledna 2016]. DOI: 10.1086/497834. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/497834>

MAHON, C. R. - LEHMAN, D. C. - MANUSELIS, G. *Textbook of diagnostic microbiology*. 4th ed. Maryland Heights, Mo.: Saunders/Elsevier, c2011. ISBN 978-1-4160-6165-6

MURRAY, P. R. - ROSENTHAL, K. S. - PFALLER, M. A. *Medical microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, c2013. ISBN 978-0-323-08692-9

OPHORI, E. A. a kol. Current trends of immunization in Nigeria: Prospect and challenges. *Tropical Medicine and Health* [online]. 2014, roč. 42, č. 2, s. 67-75 [cit. 24. dubna 2016]. DOI: 10.2149/tmh.2013-13. ISSN 1348-8945. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4139536/>

PANAGIOTOU, M. a kol. The epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria: Data from a general hospital in Athens, Greece, 2007–2013. *Pulmonary Medicine* [online]. 2014, roč. 2014, s. 1-9 [cit. 23. dubna 2016]. DOI: 10.1155/2014/894976. ISSN 2090-1836. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/pm/2014/894976/>

PTÁKOVÁ, M. Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterióz. *Medicina pro praxi* [online]. 2011, roč. 8, č. 11, s. 466-468 [cit. 28. ledna 2016]. ISSN 12148687. Dostupné také z: http://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-201111-0006_Soucasne_laboratorni_diagnosticke_moznosti_tuberkulozy_a_mykobakterioz.php

PETRÁŠ, M. Očkování proti tuberkulóze (TBC). *Vakcíny a Očkování* [online]. 2015 [cit. 16. dubna 2016]. Dostupné z: http://www.vakciny.net/doporucene_ockovani/TBC.htm

RIBÓN, W. Biochemical isolation and identification of *Mycobacteria*. *Biochemical Testing* [online]. InTech Open Access Publisher, 2012 [cit. 10. března 2016]. ISBN 978-953-51-0249-6. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/biochemical-testing/biochemical-isolation-and-identification-of-mycobacteria>

RYCHLÍKOVÁ, J. - ŠTERZL, I. Imunosenescence - vymezení pojmu a možné souvislosti. *Alergie* [online]. 2004, roč. 6, č. 4, s. 240-247. ISSN: 1212-3536 [cit. 13. dubna 2016]. Dostupné také z: http://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2004/04/07_rychlikova_al_4-04.pdf

SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4207-0

ŠŤASTNÁ, T. *Lepra versus tuberkulóza. Projevy obou nemocí na kosterních pozůstatcích člověka a jejich diagnostika*. Bakalářská práce [online]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2011 [cit. 10. prosince 2015]. Dostupné také z: http://is.muni.cz/th/269253/prif_b/

TANG, Y.-W. - STRATTON, C. W. *Advanced techniques in diagnostic microbiology*. New York, N.Y.: Springer, 2006. ISBN 978-0-387-29741-5

Tille P. M. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 13th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2014. ISBN 978-0-323-08330-0

TORTOLI, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect* [online]. 2009, roč. 15, č. 10, s. 906-910 [cit. 2. ledna 2016]. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03014.x. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14606108>

ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR. *MKN – 10: Mezinárodní klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů: desátá revize. Aktualizovaná verze, platná k 1. 4. 2014* [online]. Praha: ÚZIS ČR, 2013 [cit. 20. března 2016]. Dostupné také z: <http://www.uzis.cz/cz/mkn/seznam.html>

ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR. *Tuberkulóza a respirační nemoci 2014* [online]. Uzis.cz, 2014 [cit. 23. dubna 2016]. Dostupné také z: <http://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2014>

VAN INGEN, J. Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2013, roč. 34, č. 1, s. 103-109 [cit. 10. března 2016]. ISSN 1069-3424. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1333569>

VIVIANI, L. a kol. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF). *Journal of Cystic Fibrosis* [online]. 2016 [cit. 23. dubna 2016]. DOI: 10.1016/j.jcf.2016.03.002. ISSN 15691993. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156919931630008X>

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

WALLENFELS, J. Očkování proti tuberkulóze - pro a proti. In: *Mladá fronta: Lékařské listy* [online]. 2013 [cit. 16. dubna 2016]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/ockovani-proti-tuberkuloze-pro-a-proti-469980>

WATTERSON, S. A. - DROBNIEWSKI, F. A. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 2000, roč. 53, č. 10, s. 727-732 [cit. 10. března 2015]. ISSN 1472-4146. Dostupné na World Wide Web: <http://jcp.bmj.com/content/53/10/727.full>

WORLD HEALTH ORGANISATION. *WHO model prescribing information: drugs used in mycobacterial diseases*. Geneva: World Health Organization, 1991. ISBN 9241401036. Dostupné také z: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5511e/s5511e.pdf>

5 Seznam obrázků

Obr. 1. Typy mykologických kyselin s charakteristickými funkčními skupinami.....	- 15 -
Obr. 2. Stavba buněčné stěny mykobakterií	- 15 -
Obr. 3. Lymfadenitida u dítěte způsobená druhem <i>M. haemophilum</i>	- 19 -
Obr. 4. Burulský vřed na levém kotníku.....	- 20 -
Obr. 5. <i>M. avium-intracellulare</i> barvené fluorochromem auraminem	- 24 -
Obr. 6. Katalázový test - vlevo <i>M. fortuitum</i> (sloupec bublin vyšší než 45 mm), uprostřed neinokulovaná kontrolní zkumavka, vpravo <i>M. avium</i> (sloupec bublin vysoký méně než 45 mm).....	- 28 -
Obr. 7. Test redukce telluridu - vlevo negativní reakce <i>M. gordonae</i> , vpravo pozitivní reakce organismů MAI komplexu.....	- 29 -
Obr. 8. Kultivační lahvička BacT/ALERT [®] MB před inokulací	- 34 -
Obr. 9. BACTEC [™] MicroMGIT [™] Fluorescence Reader	- 42 -
Obr. 10. Kultivační půdy pro diagnostiku mykobakterií - zleva Löwenstein-Jensenova půda, půda dle Ogawy, Šulova půda	- 43 -

6 Seznam tabulek

Tab. 1. Přehled nejznámějších druhů mykobakterií a jejich vlastností.....	- 13 -
Tab. 2. Hodnocení mikroskopického nálezu.....	- 38 -
Tab. 3. Hodnocení pozitivních kultivačních nálezů.....	- 44 -

7 Seznam grafů

Graf 1. Procentuální zastoupení vzorků zaslaných z jednotlivých zdravotnických zařízení- 45	-
Graf 2. Zastoupení počtu požadavků na vyšetření jednotlivých pracovišť FN Brno	- 46 -
Graf 3. Zastoupení počtu požadavků na vyšetření jednotlivých pracovišť FNUSA	- 47 -
Graf 4. Procento vyšetřených mužů a žen	- 47 -
Graf 5. Histogram věkové demografie vyšetřovaných pacientů.....	- 48 -
Graf 6. Procentuální zastoupení diagnóz tříděných dle MKN-10 klasifikace	- 50 -
Graf 7. Procentuální zastoupení typů vyšetřovaných vzorků	- 51 -
Graf 8. Porovnání počtu vyšetřených vs. pozitivních mužů a žen.....	- 52 -
Graf 9. Porovnání počtu všech pozitivních vzorků, pozitivních na netuberkulózní mykobakteria a na <i>M. tuberculosis</i>	- 53 -
Graf 10. Počet pozitivních nálezů jednotlivých mykobakteriálních druhů.....	- 54 -
Graf 11. Porovnání počtu vyšetřených a pozitivních pacientů v jednotlivých věkových kategoriích	- 55 -
Graf 12. Četnost diagnóz u pozitivních pacientů.....	- 56 -