

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Karolína Míková

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

DIAGNOSTIKA MYKOBAKTERIÍ

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Jana Amlerová

PLZEŇ 2017

Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.“

V Plzni dne 28. 3. 2018

.....

vlastnoruční podpis

ANOTACE

Příjmení a jméno: Karolína Míková

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Diagnostika mykobakterií

Vedoucí práce: MUDr. Jana Amlerová

Počet stran: číslované: 48, nečíslované: 12

Počet příloh: 3

Počet titulů použité literatury: 21

Klíčová slova: mykobakterium, diagnostika, tuberkulóza, kultivace

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá laboratorní diagnostikou bakterií rodu *Mycobacterium*. Teoretická část se zaměřuje nejprve na charakteristiku tohoto bakteriálního rodu, dále obsahuje přehled jednotlivých klinicky významných druhů mykobakterií, jejich popis a patogenitu. Největší část této práce je věnována jednotlivým laboratorním metodám, které vedou k úspěšné diagnostice mykobakteriálních onemocnění. V praktické části je vyhodnocen přehled analýz vzorků klinického materiálu, které byly zpracovány v mykobakteriologické laboratoři za dané časové období. Současně tato část popisuje souhrn všech zachycených mykobakteriálních agens v této laboratoři za stejné období.

ANNOTATION

Surname and name: Karolína Míková

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Diagnosis of Mycobacteria

Consultant: MUDr. Jana Amlerová

Number of pages – numbered: 48, unnumbered: 12

Number of appendices: 3

Number of literature items used: 21

Key words: mycobacterium, diagnostics, tuberculosis, cultivation

Summary

This bachelor thesis deals with laboratory diagnosis of the bacteria *Mycobacterium*. Theoretical part is focused at first on characteristics of this bacterial genus, further, it is consisting the overview of the individual clinically significant species of mycobacteria, their description and pathogenicity. The biggest part of the thesis is dedicated to individual laboratory methods, which lead to the successful diagnostics of mycobacterial diseases. In the practical part there is evaluated the overview of analysis of the clinical material's samples, which were elaborated in the mycobacteriological laboratory over a specified period. Simultaneously this part describes the summary of all the detected mycobacterial agents in this laboratory during the same period.

Poděkování

Děkuji MUDr. Janě Amlerové za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů. Dále děkuji Fakultní Nemocnici Plzeň za poskytnutí podkladů pro praktickou část bakalářské práce.

Obsah

ANOTACE.....	5
Souhrn	5
ANNOTATION	6
Summary	6
Obsah	8
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	10
SEZNAM TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK.....	12
ÚVOD	13
TEORETICKÁ ČÁST	15
1 CHARAKTERISTIKA RODU MYCOBACTERIUM	15
1.1 Morfologie	15
1.2 Chemické složení.....	15
2 JEDNOTLIVÉ DRUHY MYKOBAKTERIÍ A JEJICH VÝZNAM	18
2.1 Mycobacterium tuberculosis (hominis).....	19
2.2 Mycobacterium bovis	21
2.3 Mycobacterium bovis BCG (bacille Calmette Guérin).....	21
2.4 Mycobacterium africanum.....	22
2.5 Mycobacterium leprae	22
3 DIAGNOSTIKA MYKOBAKTERIÍ	24
3.1 Odběr biologického materiálu a jeho transport do laboratoře	24
3.2 Dekontaminace	27
3.3 Mikroskopický průkaz mykobakterií	29
3.4 Kultivační průkaz mykobakterií	33
3.5 Identifikace izolovaných kmenů mykobakterií	39
3.6 Molekulárně genetické metody	42

3.7 Stanovení citlivosti na antituberkulotika	43
3.8 Nepřímá diagnostika tuberkulózy.....	44
PRAKTICKÁ ČÁST.....	46
4 CÍL PRÁCE	46
5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	47
6 METODIKA PRÁCE	48
7 VÝSLEDKY	50
8 DISKUZE	53
9 ZÁVĚR	54
Informační zdroje:	55

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Schéma buněčné stěny mykobakterií

Obrázek č. 2 Mikroskopický nález *M. tuberculosis* v preparátu obarveném metodou dle Ziehl-Neelsena

Obrázek č. 3 Kolonie *M. tuberculosis* na L-J půdě

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Klasifikace některých mykobakterií dle patogenity

Tabulka č. 2 Hodnocení nálezu ART v preparátu barveném dle Ziehl-Neelsena

Tabulka č. 3 Hodnocení nálezu ART ve fluorescenční mikroskopii

Tabulka č. 4 Hodnocení pozitivních kultur při kultivačním vyšetření

Tabulka č. 5 Přehled kritických koncentrací u základních AT

Tabulka č. 6 Porovnání jednotlivých metod identifikace mykobakterií

Tabulka č. 7 Druhy klinického materiálu a počty vzorků v jednotlivých typech zdravotnických zařízení

Tabulka č. 8 Počet pozitivních vzorů podle mykobakteriálních druhů a typu materiálu

Tabulka č. 9 Počet pacientů s pozitivním výsledkem podle jednotlivých druhů mykobakterií – klinicky významné nálezy

Tabulka č. 10 Počet pacientů s pozitivním výsledkem podle jednotlivých druhů mykobakterií – klinicky nevýznamné nálezy

SEZNAM ZKRATEK

ART – acidorezistentní tyčky
AT – antituberkulotikum
BBL MGIT – označení zkumavek s kulturačním médiem pro BactecMGIT 960
BCG – bacille Calmette Guérin
BAL – bronchoalveolární laváž
BAT – bronchoalveolární tekutina
BK – bacil Kochův
DS – deoxycholát sodný
EMB – etambutol
HA – hydroxiamin
IČO – identifikační číslo organizace
IF N- γ – interferon gama
IGRA – interferon gamma release assay
INH – izoniazid
L-J – Löwenstein-Jensenova
LV – laryngeální výtěr
MALDI – TOF MS – Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
MGIT – Mycobacterium Growth Indicator Tube
MIC – minimální inhibiční koncentrace
MPT 64 – protein 64 produkovaný *M. tuberculosis*
NTM – netuberkulózní mykobakteria
PCR – polymerázová řetězová reakce
PNB – p-nitrobenzoát sodný
PPD – purified protein derivative
PZA – pyrazinamid
RIF – rifampicin
STM – streptomycin
TBC – tuberkulóza
TCH – hydrazid kyseliny thiofen-2-karbonové
UV – ultrafialový
WHO – světová zdravotnická organizace

ÚVOD

V této práci se zabývám problematikou diagnostiky bakterií rodu *Mycobacterium*. Mezi nejznámější mykobakteriální druh patří bezpochybně *Mycobacterium tuberculosis*, které spolu s *M. bovis* a *M. africanum* vyvolává onemocnění zvané tuberkulóza (TBC).

Tuberkulóza je specifické infekční onemocnění, které je celosvětově natolik rozšířené, že můžeme hovořit o pandemii. Tuberkulózní nákazy nejsou problémem pouze v rozvojových zemích, ale stále více ohrožují i země civilizované. To je způsobené hlavně vznikem nových rezistentních kmenů mykobakterií, které odolávají současným léčebným postupům. Z celosvětového hlediska představuje TBC zcela zásadní problém. Ročně na toto onemocnění umírají téměř 2 miliony lidí.

Podle odhadů je bakterií *M. tuberculosis* infikovaná zhruba jedna třetina světové populace. Ve velké části případů však onemocnění nepřechází do aktivní formy tuberkulózy a jedinci zůstávají asymptomatictí. Tento stav se nazývá latentní infekce. Lidé s touto formou infekce musí čelit celoživotnímu riziku, že v případě oslabení organismu může dojít k aktivaci tuberkulózy. Imunosuprese je vyvolávána mimo jiné virem HIV (Human Immunodeficiency Virus), se kterým je onemocnění tuberkulózu úzce spjato. U lidí nakažených HIV patří TBC mezi hlavní příčiny úmrtí.

Tuberkulóze je nutné věnovat pozornost také z důvodu současné migrace obyvatelstva. Většina imigrantů pochází z oblastí, kde je vysoká míra incidence tuberkulózy. V hostitelské zemi pak dochází k šíření infekce, zvláště nebezpečnými jsou zejména polyrezistentní kmeny. Zcela nás neochrání ani očkování. Významným faktorem v boji s TBC je i společenský zájem o tuberkulózu a kontrola tohoto onemocnění.

Prognózu tohoto onemocnění můžeme považovat za dobrou, pokud je včas a správně léčeno. Proto je právě rychlá, přesná a včasná diagnostika velmi důležitá. Rozhodujícím kritériem je laboratorní průkaz mykobakterií v patientském vzorku. Odlišná stavba buněčné stěny mykobakterií způsobuje obtížnější laboratorní diagnostiku, která se liší od běžných postupů při průkazu jiných bakteriálních rodů. Mezi nejčastěji využívané laboratorní metody průkazu mykobakterií patří stále kultivace, která trvá přibližně 4–12 týdnů z důvodu pomalého růstu těchto bakterií. Proto je pro efektivnější diagnostiku velmi důležitý rozvoj nových laboratorních metod, v současnosti zejména molekulárně genetických, které zajišťují předběžné výsledky již v řádu několika hodin.

Cílem této práce je vytvořit ucelený přehled dostupných laboratorně diagnostických metod, používaných k diagnostice mykobakterií. V praktické části se pak zaměřuji na laboratorní metody vyžívané v konkrétní mykobakteriologické laboratoři, jejichž výsledkem je přehled provedených analýz klinických vzorků a vyhodnocení zachycených mykobakteriálních agens za dané časové období.

TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA RODU MYCOBACTERIUM

Bakterie rodu *Mycobacterium* se řadí do čeledi Mycobacteriaceae a řádu Actinomycetales (Křepela, 1995). Rod *Mycobacterium* zahrnuje v současnosti více než 150 druhů a poddruhů bakterií (Biological Library, online). Některá jsou pro člověka obligatorně patogenní, nazývají se pravá mykobakteria, druhou skupinou jsou mykobakteria netuberkulózní (atypická). Netuberkulózní mykobakteria mohou být nepatogenní, nebo se jedná o patogeny podmíněné, které mohou být nebezpečné zejména u osob se sníženou imunitou, nebo způsobují onemocnění pouze u zvířat (Netval, 2004).

1.1 Morfologie

Mykobakteria v mikroskopu vypadají jako krátké, tenké, mírně prohnuté tyčinky o délce 1–4 μm a šířce 0,3–0,5 μm . Tyčinky se mohou vyskytovat buď izolovaně, ale častěji se uspořádávají do podélných shluků. Jsou nepohyblivé, na koncích nebo ve středu tvoří granula. Z hlediska vztahu ke kyslíku jsou aerobní, některá mikroaerofilní a netvoří spóry (Křepela, 1995).

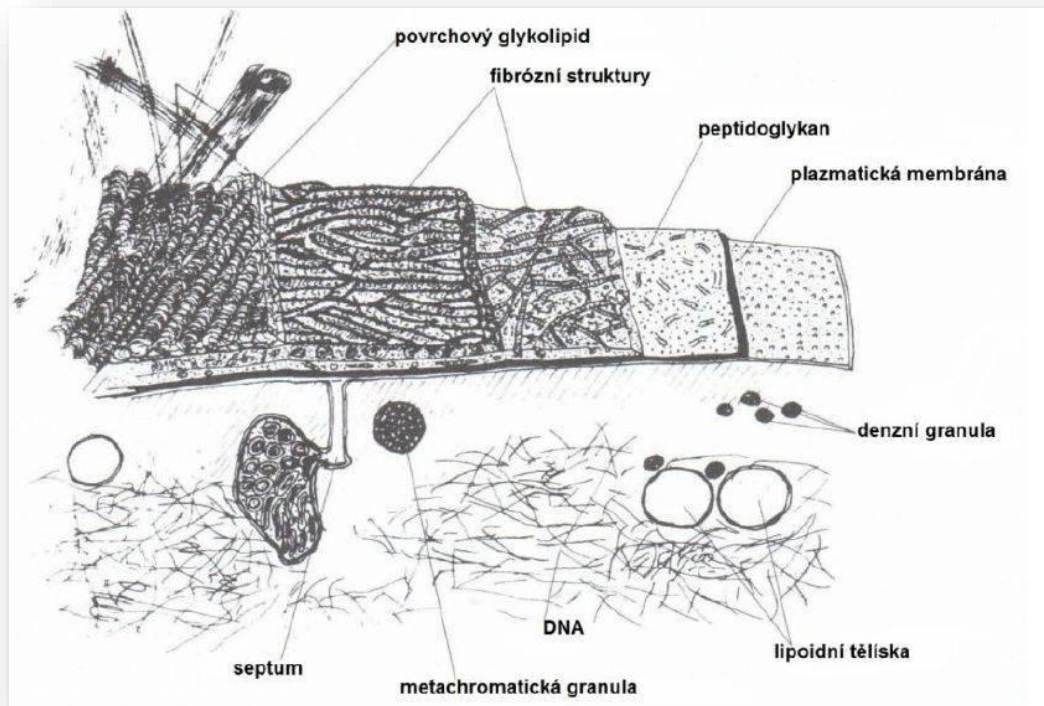
Jejich společným znakem je stavba buněčné stěny odlišná od běžných druhů bakterií, proto vyžadují speciální barvení. Nebarví se klasickými anilinovými barvivy, jsou tzv. acidoalkoholorezistentní. Tato vlastnost znamená, že jsou odolné vůči kyselinám, alkoholům, ale i louhům, což jim pomáhá lépe přežít v těchto roztocích, a mohou být odolné i vůči desinfekčním prostředkům (Křepela, 1995). Za jejich odolnost je zodpovědné voskové pouzdro, které je chrání také před vysycháním (Tomášek, 1938).

1.2 Chemické složení

Tělo mykobakterie je složeno z 60 % vodou. Buněčná stěna mykobakterií obsahuje značné množství tuků (30–40 %). Tyto lipidy obsahují kyselinu mykolovou, fosfolipidy, vosk D a glykolipidy. Lipidy mykobakterií jsou toxické pro jejich hostitele. Další důležitou složkou mykobakterií jsou polysacharidy, které jsou složeny z arabinózy, galaktózy, manózy a glukanu. Lipopolysacharidy zajišťují permeabilitu membrány a mají uplatnění při sérologických reakcích. Biologicky neaktivnější částí jsou proteiny, které

se elektroforeticky dělí na frakce A, B a C. Proteiny tvoří antigeny, ty jsou nejsilnější ve frakci A. Nedílnou součástí mykobakteriální buňky jsou také nukleové kyseliny a pigmenty (Křepela, 1995; Netval, 2004).

Obrázek č. 1 – Schéma buněčné stěny mykobakterií



Zdroj obrázku: M. Bednář, V. Fraňková, J. Schindler, A. Souček, J. Vávra: Lékařská mikrobiologie. Marvil, 1996, s. 306.

2 JEDNOTLIVÉ DRUHY MYKOBAKTERIÍ A JEJICH VÝZNAM

Tabulka č. 1 uvádí přehled základních mykobakteriálních druhů podle patogenity.

Tabulka č. 1 Klasifikace některých mykobakterií dle patogenity

Pravá mykobakteria	Netuberkulózní mykobakteria	
Obligatorně patogenní mykobakteria	Potenciálně patogenní mykobakteria	Nepatogenní mykobakteria
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. goodii</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. flavescens</i>
<i>M. bovis BCG kmen</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. africanum</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. microti</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. leprae</i>	<i>M. szulgai</i>	
	<i>M. xenopi</i>	
	<i>M. avium-intracellulare</i>	
	<i>M. ulcerans</i>	
	<i>M. malmonensae</i>	
	<i>M. haemophilum</i>	
	<i>M. shimodei</i>	
	<i>M. fortuitum</i>	
	<i>M. chelonae</i>	

Zdroj: Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998

Pravá mykobakteria jsou pro člověka striktně patogenní, proto jsou klinicky velmi významná. Do této skupiny patří zejména tzv. mykobakteria tuberkulózního komplexu (tj. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG kmen* a *M. africanum*). Skupina těchto mykobakterií vyvolává onemocnění zvané tuberkulóza, a to u lidí i u některých zvířat. Tuberkulóza se vyskytuje v několika formách, z nichž nejčastější je její plicní forma. Dále

sem patří *M. leprae*, způsobující onemocnění lepra (malomocenství) (Netval, 2004; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

2.1 *Mycobacterium tuberculosis (hominis)*

M. tuberculosis (MTB), ve starších pramenech někdy nazývané jako *M. hominis*, je klinicky nejvýznamnější mykobakterium. Je původcem asi 95 % všech tuberkulózních nálezů. Řadí se do tzv. tuberkulózního komplexu mykobakterií. Je nazýváno také jako bacil Kochův (BK), a to podle jména jeho objevitele – německého lékaře – Roberta Kocha. Tento významný objev se stal v roce 1882 a později za něj dostal Robert Koch Nobelovu cenu (Homolka, 2003; Křepela, 1995).

2.1.1 Morfologická charakteristika

M. tuberculosis je krátká, rovná nebo lehce zahnutá tyčinka, dosahující délky 1,5–5 µm. Je nepohyblivá, v nátěru se často nachází v podobě paralelně orientovaných provazců. Optimálně roste při teplotě 37–38 °C a ke svému přežití vyžaduje kyslík – je výrazně aerobní. Avšak její růst na všech kultivačních médiích je velmi pomalý, kultivace trvá minimálně dva týdny od inokulace. Důvodem je velmi dlouhá generační doba, mykobakteriální buňka se začíná dělit až po 20–30 hodinách od jejího vzniku (u ostatních bakterií bývá generační doba dlouhá 20–30 minut). Například na vaječných půdách roste *M. tuberculosis* ve formě drsných, suchých kolonií, které jsou krémově zbarvené a mají drobnou strukturu. V tekutých půdách je můžeme pozorovat ve formě bílých granul, jež nejdou roztřepat.

Buněčná stěna obsahuje velké množství lipidů, proto jsou tyto tyčinky silně acidorezistentní. Díky této vlastnosti se dají snadno izolovat od ostatních mikrobů. Jsou vysoce hydrofobní, stavbou jejich buněčné stěny připomínají spíše grampozitivní bakterie, ale nedají se obarvit podle Grama. Nejčastěji je barvíme metodou dle Ziehl-Neelsena, kde se obarví kyselým karbolfuchsinem. V mikroskopu je poté jejich struktura obarvena červeně, pozadí je většinou světle zelené nebo blankytně modré. Často se mykobakteria označují také pomocí fluorochromů, tyčinky poté ve fluorescenčním mikroskopu září žlutozeleně na temně červeném pozadí (Netval, 2004; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

2.1.2 Odolnost, virulence a antigeny

MTB žijí intracelulárně, ale dokáží dlouho přežít i extracelulárně. Jsou odolné proti vysychání, ale ničí je sluneční záření a teploty nad 60 °C. Vůči nižším teplotám jsou odolnější, ve zmrzlém materiálu jsou bez poškození svých funkcí schopna přežít i roky. Jejich odolnost je i k některým dezinfekčním prostředkům. Spolehlivě je likviduje 5% lyzol nebo chlorseptol s chlorem a aktivovanými solemi. Před MTB se můžeme chránit také sterilizací v autoklávu, obecně je spolehlivě ničí teploty kolem 90 °C, což se využívá při pasterizaci (Křepela, 1995; Netval, 2004).

M. tuberculosis netvoří žádné endotoxiny ani exotoxiny. Na virulenci MTB se podílí hlavně tyto glykolipidy: kord faktor a sulfatidy. Kord faktor zajišťuje jeho toxicitu, působí na mitochondriální membránu a tím inhibuje respiraci a fosforylaci. Sulfatidy mají schopnost potlačení tvorby fagolyzozomů a brání fagocytóze. Virulence může být různá, může se spontánně vytratit nebo se ztráty virulence uměle využívá při oslabování kultivační technikou, například u BCG kmene bovinních mykobakterií, jež se využívají při vakcinaci. Mezi další důležité mykobakteriální glykolipidy patří například peptidoklykolipid, arabinogalaktan nebo lipoarabinomanan.

Mykobakteriální infekce, jako například tuberkulóza, se je provázena přítomností antigenů. Tyto látky jsou produktem mykobakteriální buněčné stěny a jejich cytoplazmy. Nejvýznamnějším antigenem je tuberkulin, který roku 1891 objevil Robert Koch. Izoloval různé druhy tuberkulinů a zkoušel je využívat terapeuticky a diagnosticky. Dříve se tuberkulin připravoval ze zahuštěné tekuté půdy po oddělení mykobakterií (starý tuberkulin). Dnes se tuberkulin získává z vysráženého proteinového komplexu z filtrátu mykobakterií a označujeme ho jako PPD (purified protein derivative). Využívá se při tzv. Mantouxově kožním testu, kdy se PPD aplikuje pod kůži. U zdravých osob nevyvolává žádnou reakci, ale u očkovaných nebo tuberkulózu infikovaných jedinců se v místě vpichu objevuje zánětlivá kožní reakce (BEDNÁŘ, 1996; Tomášek 1938).

Tento druh mykobakteria vyvolává tuberkulózu hlavně u člověka, primátů a u některých zvířat, jež jsou s lidmi v kontaktu. Experimentálně je patogenní pro morčata, křečky a myši. Ve východní Africe a v jihovýchodní Asii se vyskytuje tzv. indická forma *M. tuberculosis*, která se do Evropy může přenést imigranty z těchto zemí (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

2.2 *Mycobacterium bovis*

M. bovis je obligatorně patogenní mykobakterie, která spolu s *M. tuberculosis* a *M. africanum* a některými dalšími druhy tvoří tzv. tuberkulózní komplex. Na rozdíl od *M. tuberculosis* způsobuje tuberkulózu zejména u hovězího dobytka, ale ojedinelé se přenáší i na člověka.

2.2.1 Morfologická charakteristika

Tyčinky *M. bovis* jsou silnější, granulované a různě dlouhé. Svými vlastnostmi připomínají *M. tuberculosis*. Rozdílem je, že nejsou aerobní jako *M. tuberculosis*, ale lépe se jim daří za mikroaerofilních podmínek. Pro svůj růst vyžadují teplotu 37 °C. Nejlépe rostou na vaječných půdách obohacených o pyrohroznan sodný, a to ve formě drobnějších, plochých, bezbarvých a lesklých kolonií. V tekutých půdách jsou kolonie bílé a neroztřepatelné (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Tomášek, 1938).

2.2.2 Virulence a patogenita

Toto mykobakterium přežívá v kulturách déle než *M. tuberculosis*. Má velmi podobný genom, jejich antigeny jsou shodné. Společné mají i tuberkuliny, které se liší jen reakcí. *M. bovis* vyvolává tuberkulózu hlavně u hovězího dobytka, dalších domácích zvířat, např. u vepřů nebo divoce žijících živočichů. Může se přenést i na člověka a ostatní primáty, dnes už jen velmi vzácně. U člověka nevyvolává plicní tuberkulózu, ale tuberkulózu lymfatických krčních uzlin. Dříve se toto onemocnění přenášelo především nepasterizovaným mlékem, ale v roce 1968 se v bývalém Československu povedlo tuberkulózu skotu eradikovat (Tomášek, 1938; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Homolka, 2003).

2.3 *Mycobacterium bovis* BCG (bacille Calmette Guérin)

Jedná se o uměle vytvořený kmen mykobakteria s velmi nízkou virulencí, který vznikl dlouhodobou kultivací z *M. bovis*. Vyrábí se z něj vakcína, využívaná k očkování proti tuberkulóze.

Mikrob svou morfologií připomíná spíše *M. tuberculosis*, a to jak v mikroskopickém preparátu, tak v narostlých kulturách. Biochemické vlastnosti má

podobné jako *M. bovis*, od kterého byl odvozen. Francouzští lékaři Albert Calmette a Camille Guérin izolovali *M. bovis* z vemene tuberkulózně infikované krávy a kultivovali jej na bramborové půdě s příměsí žluče. Asi po 13 letech stovek opakovaných kultivací docílili snížení jeho virulence na minimum, a proto je tento kmen používán pro vakcinaci proti TBC. U osob se sníženou imunitou a u vnímavých jedinců může vyvolávat postvakcinační komplikace (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Homolka, 2003).

2.4 Mycobacterium africanum

Toto obligatorně patogenní mykobakterium spadá do bakterií tuberkulózního komplexu. Způsobuje tuberkulózu u lidí žijících především ve středovýchodní Africe, u nás se může vyskytovat přenosem z afrických oblastí cestou imigrace. V Evropě bylo zatím onemocnění popsáno v Německu a Anglii (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Křepela, 1995).

2.4.1 Morfologická charakteristika

Tyčinky *M. africanum* se mikroskopicky podobají *M. tuberculosis* i *M. bovis*. Ve vaječných půdách rostou minimálně 3 týdny při 37 °C. Kolonie jsou ploché a drsné, mohou mít centrální vyvýšení. Jsou nepigmentované nebo mohou mít krémové zbarvení (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

2.5 Mycobacterium leprae

M. leprae způsobuje na rozdíl od předchozích mykobakterií onemocnění zvané lepra. Říká se jí též malomocenství nebo Hansenova choroba. Právě norský mikrobiolog G. A. Hansen toto mykobakterium v roce 1874 objevil v lepromech (uzlíky vyskytující se na postižené kůži) (Seghal, 2006).

2.5.1 Morfologická charakteristika

Morfologicky bakterie také vypadají jako tyčinky, jsou granulované a dlouhé 1,5–8 µm. Mohou být rovné nebo lehce prohnuté, shlukují se ve svazečky a kulovité útvary (globi), které jsou stmelené zbytky rozpadlých mykobakterií. Jsou to intracelulární patogeny a jsou silně acidorezistentní. Barví se dle Grama gram-pozitivně, ale používá se speciální barvení na acidorezistenci, dle Ziehl-Neelsena. Nevýhodou při výzkumu a léčbě

onemocnění způsobené *M. leprae* je, že se velmi špatně kultivuje. Proto se onemocnění vyšetřuje převážně geneticky (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Sehgal, 2006).

M. leprae vyvolává onemocnění pouze u člověka, některých druhů opic a u pásovce. Lidé se mohou nakazit buď kožní formou, nebo nervovou formou malomocenství. Obě formy začínají tvorbou uzlíků na kůži – tzv. lepromů. Onemocnění se vyskytuje převážně v tropických zemích, hlavně ve střední Africe a jihovýchodní Asii, ojediněle i v jižní Evropě (Tomášek, 1938; Sehgal, 2006).

3 DIAGNOSTIKA MYKOBAKTERIÍ

3.1 Odběr biologického materiálu a jeho transport do laboratoře

Výběr vhodného biologického materiálu a správné zásady odběru jsou pro kvalitní výsledek mikrobiologického vyšetření nezbytné. Materiál odebíráme ve správnou dobu, ideálně před zahájením antibiotické léčby, ze správného místa – tedy tam, kde předpokládáme výskyt bakterií. Nejčastěji zasílaným biologickým materiálem pro diagnostiku plicní formy tuberkulózy i jiných plicních forem mykobakterií (onemocnění způsobená netuberkulózními mykobakterií) je sputum. Kromě spontánně vykašlaného nebo indukovaného sputa je vhodné vyšetření bronchoalveolární tekutiny (BAT), je možné vyšetřit i žaludeční šťávu nebo laváž. Nevhodnými vzorky pro tuto diagnostiku jsou různé formy výtěrů z dýchacích cest. Pro mykobakterií a tuberkulózy lokalizované jinde, než v plicích vybíráme vhodný biologický materiál podle místa procesu. Jedná se například o likvor, hnis, moč nebo tkáňové biopsie. U diseminovaných infekcí můžeme pro vyšetření použít také vzorek krve nebo stolice (Votava, 2000; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

Biologický vzorek odebíráme zásadně do sterilních souprav, obvykle dodávaných komerčně. Odběr je prováděn zkušeným pracovníkem, nejčastěji zdravotní sestrou, ve speciální místnosti, kde je zajištěn řádný úklid, dezinfekce povrchů a odvětrání. Pověřený pracovník musí odběrovou nádobku označit jménem pacienta, jeho rodným číslem a sterilně odebrat dostatečné množství vzorku. Odebraný vzorek je doprovázen průvodním listem, tzv. žádankou o mikrobiologické vyšetření, kde je uveden druh biologického materiálu, identifikace žádajícího oddělení, včetně adresy a kontaktu, identifikace ošetřujícího lékaře, jeho odbornost, IČO, razítko a podpis, datum a čas odběru, identifikace pacienta – jeho jméno a přímení, rodné číslo, bydliště, základní diagnóza a kód jeho zdravotní pojišťovny. V případě potřeby mohou být uvedeny další doplňující informace (Votava, 2000; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

Vzorek s průvodním listem je ihned po odběru transportován do laboratoře, kde se musí zpracovat nejpozději do 24 hodin. Není-li možné transport ihned realizovat, je nutno vzorek skladovat v chladničce při 2–4 °C a zabránit působení přímého slunečního

záření. Vlastní transport musí být šetrný, aby nedošlo k rozbití a vylití obsahu, průvodní list je zabalen v umělohmotné fólii, kvůli kontaminaci. Materiál vkládáme do termoboxů, zejména v letních měsících, aby nedocházelo k velkým výkyvům teploty a znehodnocení vzorku (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.1 Sputum

Sputum neboli sekret z dolních cest dýchacích patří mezi nejvhodnější materiály s největší výtěžností mykobakterií. Jedná se o vazký sekret, který je získán vykašláním, nesmí být zaměněn za sliny. Sputum je odebíráno obvykle ráno nalačno, nejlépe před hygienou dutiny ústní. Pacient důkladně vykašlává sekret se zavřenými ústy, který je následně odebrán do speciální umělohmotné kónické nádoby se širokým hrdlem, tzv. sputničky. Objem kvalitního vzorku by měl být 2–5 ml (Votava, 2000; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.2 Indukované sputum

Takzvané indukované sputum se odebírá u pacienta, který nemůže sekret spontánně vykašlat. Před odběrem dochází k inhalaci solného roztoku, obsahujícího 15 % NaCl a sterilní destilovanou vodu. V inhalátoru vzniká aerosol tohoto roztoku, jež pacient vdechuje 2–3 minuty. Vlastní odběr poté probíhá vykašláním sputa 15–30 minut po inhalaci (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.3 Bronchoalveolární laváž (BAL)

Cílem tohoto vyšetření je získat bronchoalveolární tekutinu pro vyšetření buněčných i nebuněčných složek. Pacientovi se do segmentálního bronchu zavede bronchoskop a postupně se do průdušky aplikuje fyziologický roztok v několika menších frakcích, který je současně zpět odsáván. Celkové množství aplikovaného fyziologického roztoku je 150–300 ml. Toto vyšetření se může provádět pod lokální anestezii (Stanley et al, 1991).

3.1.4 Žaludeční výplach

Tento výkon se provádí nalačno, pacientovi je do žaludku zavedena žaludeční sonda. Následně je odsáto 50-100 ml obsahu pomocí sterilní stříkačky. Pacientovi můžeme dát před odběrem vypít 50-100 ml vlažné sterilní destilované vody. Vzorek musí

být ihned dopraven do laboratoře a zpracován do 4 hodin po odběru. V opačném případě se materiál neutralizuje roztokem fosforečnanu nebo uhličitanu sodného a zpracuje se ihned jak je to možné (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.5 Moč

Mykobakterie se ve vzorku moče prokazují obtížně, proto se odebírá více vzorků moči několik dní po sobě. Moč se odebírá ráno, do sterilních nádobek se širokým hrdlem, v množství 50–100 ml (Křepela, 1995; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.6 Likvor, punktát, pleulární výpotek

Jedná se o sterilní materiál, který se odebírá v množství 3–5 ml do sterilní zkumavky. Při odběru je nutné striktně dodržet aseptické podmínky (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.7 Výtěry a stěry z abscesů nebo píštělí, hnisavých procesů a ran

Tekutý materiál se nasaje do injekční stříkačky v množství nejvýše 10 ml. Pokud tekutý materiál odebrat nelze, k získání vzorku z postiženého ložiska se použijí vatové tampony nebo laryngeální výtěrky navlhčené v destilované vodě (Křepela, 1995; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.8 Menstruační krev

Vzorek menstruační krve se odebírá v prvních třech dnech menstruace. Získá se zavedením sterilního gázového tamponu do pochvy alespoň na 3 hodiny. Po vynětí se tampon ihned odešle do laboratoře, nejčastěji ve sterilní Petriho misce. Menstruační krev se odebírá opakovaně, nejlépe 3 dni po sobě. Pro průkaz gynekologické tuberkulózy je vhodnější použít materiál získaný kyretáží (Křepela, 1995; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.9 Stolice

Odebírá se vzorek stolice o velikosti lískového oříšku, odběr se sériově opakuje. K odběru i transportu jsou užívány parazitologické zkumavky s lopatičkou (Křepela, 1995; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.10 Bioptický materiál

Bioptický nebo sekční materiál je odebírán chirurgicky, vzorek tkáně by měl být o velikosti přibližně 2 cm³. Ukládá se do sterilních nádobek, ve kterých nesmí být přidána žádná fixační ani konzervační tekutina. Takovéto vzorky se v laboratoři homogenizují rozetřením se sterilním mořským pískem nebo s rozdrcenými sterilními krycími sklíčky. Homogenizace probíhá v tkáňovém homogenizátoru (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.11 Laryngeální výtěr

Laryngeální výtěr se získává ráno, nalačno, před provedením hygieny dutiny ústní. Vzorek se odebírá na 3 laryngeální sondy, které musí být navlhčeny sterilní destilovanou vodou, kvůli životnosti mykobakterií. Laryngeální sonda je ze speciálního chrommolybdenového drátku. Pacient vyplázne jazyk, sonda je zavedena nad epiglottis a následně je vyzván k prudkému zakašlání. Tampon je pak zasunut zpět do zkumavky.

Vzhledem k nízké průkaznosti mykobakterií v tomto materiálu, například oproti průkaznosti ze sputa, která o více než 50 % vyšší, se laryngeální výtěr provádí výjimečně. Pro odebírající personál je tento úkon velice rizikový. Před případnou infekcí se chrání rouškou, štítem, pokrývkou hlavy, gumovou zástěrou a rukavicemi. Samotný odběr probíhá v místnosti vybavené germicidními zářiči (Křepela, 1995; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.1.12 Krev

Krev se odebírá na vyšetření metodami IGRA (interferon gamma release assay). Tyto metody detekují interferon gama produkovaný senzibilizovanými T lymfocyty po stimulaci in vitro tuberkulózními antigeny. Umožňují detekci tuberkulózních antigenů v organismu, ale nedokáží rozlišit mezi latentní a aktivní formou tuberkulózy (Amlerová, 2016).

3.2 Dekontaminace

Před zhotovením mikroskopického preparátu a kultivací je nutné biologický materiál zpracovat. Aby nedocházelo k ovlivňování vyšetření přítomností jiných mikrobiálních kultur, provádí se tzv. dekontaminace. Dekontaminace využívá relativní odolnosti mykobakterií vůči kyselinám, zásadám a detergentům, původní mikrobiální

flóra tuto odolnost nemá, a dochází tedy k potlačení jejího růstu. K dekontaminaci se využívá tzv. Petroffovy metody za použití roztoku hydroxidu sodného, metody s laurylsulfátem sodným nebo metody s N-acetyl-L-cysteinem. Následuje homogenizace vzorku pomocí mechanického třepání i samotným působením dekontaminačních činidel. Vzorek se pak koncentruje centrifugací a k nátěru se používá pouze jeho sediment. Stejného postupu se využívá i u kultivačních metod. Zpravidla se z takto připraveného vzorku provádí nejprve naočkování na kultivaci, teprve poté se připravuje mikroskopický preparát (Amlerová a kol, 2015, online; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998)

3.2.1 Dekontaminační metody

Jednou z nejčastějších dekontaminačních metod je modifikovaná metoda Petroffova. Tato metoda využívá 1 molární roztok hydroxidu sodného (NaOH), který vzorek dobře dekontaminuje i homogenizuje. Během této metody je vzorek několikrát protřepáván, centrifugován a ředěn sterilní destilovanou vodou. Vzniklý sediment se resuspenduje v 0,5–1 ml sterilního fyziologického roztoku a očkuje se pomocí Pasteurovy pipety nebo kalibrované kličky na jedno použití. Další metoda moření využívá působení laurylsulfátu sodného ve směsi s 1 % NaOH, zde je vzorek neutralizován roztokem kyseliny chlorovodíkové (HCl). Po homogenizaci a centrifugaci je supernatant resuspendován v 0,5–1 ml sterilního fyziologického roztoku a očkovan na kultivační půdy Pasteurovou pipetou. Po dekontaminaci vzorku metodou s laurylsulfátem sodným nelze očkovat na Šulovu tekutou půdu, ani na ostatní tekuté půdy, kvůli částečné denaturaci bílkoviny. Dekontaminaci lze provést také metodou s N-acetyl-L-cysteinem, který je přidán do směsi roztoků NaOH a citrátu sodného. Tímto roztokem se vzorek dobře dekontaminuje a homogenizuje. Přidá se fosfátový pufr a po centrifugaci se sediment rozpustí ve sterilním fyziologickém roztoku. Laryngeální výtěry se dekontaminují speciálně s roztoky HCl a NaOH, které jsou současně titrovány za pomoci alkoholového roztoku fenolftaleinu. Speciální dekontaminaci vyžadují také vzorky moči. Zde se přidává roztok kyseliny sulfosalicylové a po centrifugaci je sediment smísen se 4 % roztokem kyseliny sírové (H₂SO₄). Vzorek se centrifuguje podruhé a následně je přidán ampicilin nebo penicilin rozpuštěný ve sterilní destilované vodě. Sediment vhodný k očkování na půdy získáme po třetí centrifugaci (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Votava, 2000).

3.3 Mikroskopický průkaz mykobakterií

Mikroskopický průkaz acidorezistentních tyček v biologickém materiálu je velice cennou metodou. Vyšetření je rychlé, jednoduché a ekonomicky výhodné. Je využíváno při vyhledávání pacientů s aktivní formou tuberkulózy i při kontrolování úspěšnosti léčby u pacientů s probíhající chorobou. Přesto se jedná pouze o vyšetření doplňkové, které probíhá současně s jinou metodou stanovení, nejčastěji kultivací, a nelze podle něj stanovit diagnózu. Pro průkaz acidorezistentních tyček (ART) v mikroskopickém preparátu je nutná minimální koncentrace 10^5 ART v 1 ml vyšetřovaného materiálu. Výsledek této přímé diagnostické metody je vyjádřen pouze kvalitativně – materiál je buď pozitivní, nebo negativní na přítomnost ART. Mikroskopicky pozitivní výsledek musí být nahlášen ihned po zjištění (Votava, 2003; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

Mikroskopický nátěr provádíme na čistá a odmaštěná podložní sklička, která jsou řádně označena příslušným číslem vzorku. Na skličko se přenese kapka sedimentu a rovnoměrně se rozetře pomocí bakteriologické kličky. U čirých vzorků, jako je například likvor nebo punktát, provádíme vícevrstevný nátěr, pro větší pravděpodobnost zachycení acidorezistentních tyček v preparátu. Hustý materiál, například hnís, je po nanesení na sklo suspendován v kapce fyziologického roztoku nebo sterilní destilované vody. Mikroskopický nátěr lze zhotovit taktéž z již narostlých kolonií. V takovémto případě je k materiálu rovněž přimíchána kapka sterilní destilované vody či fyziologického roztoku. Nátěry se nechají uschnout při laboratorní teplotě nebo lze sušení urychlit v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě do 60 °C, nikoliv však nad plamenem. Pro mikroskopický průkaz mykobakterií jsou využívány dvě metody barvení. Acidoalkoholerezistentní tyčky barvíme metodou dle Ziehl-Neelsena nebo jsou k barvení používány fluorchromy za použití fluorescenční mikroskopie (Amlerová a kol, 2015, online; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.3.1 Barvení dle Ziehl-Neelsena

Před barvením dle Ziehl-Neelsena preparát fixujeme v horkovzdušném sterilizátoru teplotou 105 °C po dobu 10 minut. Fixované preparáty rozložíme na barvicí mřížku tak, aby se navzájem nedotýkaly. Následuje přelití roztokem karbolfuchsinu,

který necháme působit 5 minut. Mezitím zahříváme preparát nad plamenem, až do výstupu par. Nesmí dojít k varu ani odparu barviva. Barvivo slijeme a nátěr opláchneme pod slabým proudem vody. Následuje odbarvení odbarvovacím roztokem. Odbarvujeme obvykle 2–3 minuty, dokud barvivo odtéká (silnější nátěry se odbarvují déle). Roztok se slije a preparát opláchneme vodou. Poté nátěr dobarvujeme za použití dobarvovacího roztoku obsahujícího malachitovou zeleň nebo metylénovou modř, který necháme působit 20–60 sekund. Nakonec roztok slijeme, preparát opláchneme vodou a necháme usušit (složení barviv je uvedeno v příloze č. 2) (Amlerová a kol, 2015, online; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

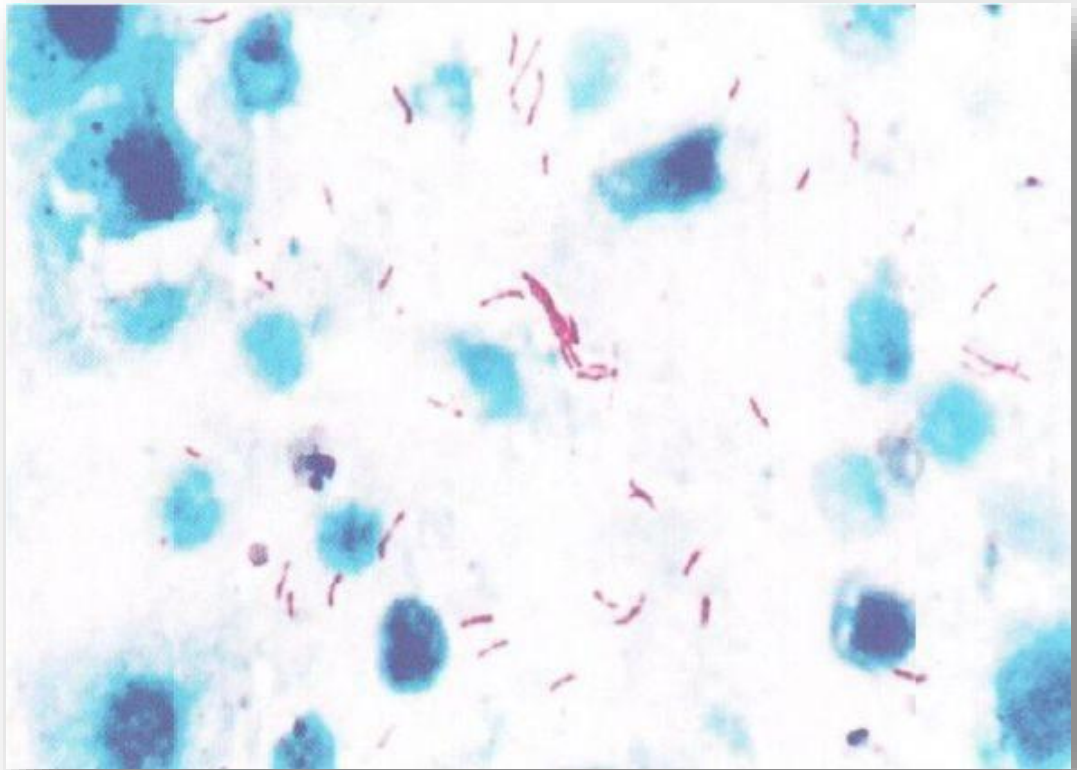
Takto připravený preparát hodnotíme pod světelným mikroskopem. Celkové zvětšení je 1000x (100x zvětšení objektivu, 10x zvětšení okuláru), za použití imerzního oleje. Celkem hodnotíme asi 50 zorných polí, v různých místech preparátu. Meandrovitým pohybem postupujeme po třech podélných pružích a hledáme acidorezistentní tyčky, které se jeví červeně. Pozadí je světle zelené nebo světle modré, podle použitého barviva. Výsledek vyšetření odečteme podle tabulky č. 2 (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998). Obrázek č. 2 ukazuje *M. tuberculosis* v preparátu obarveném podle Ziehl-Neelsena.

Tabulka č. 2 Hodnocení nálezu ART v preparátu barveném dle Ziehl-Neelsena

0	ART nenalezeny
1-9	Ojedinelé ART (do 9 ART v preparátu, udává se počet)
+	10–21 ART
++	21–100 ART
+++	Více než 100 ART

Zdroj: Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998

Obrázek č. 2 Mikroskopický nález *M. tuberculosis* v preparátu obarveném metodou dle Ziehl-Neelsena



Zdroj: M. Votava a kol.: Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, 2006, obrázková příloha, obrázek č. 21, ISBN 80-902896-6-5.

3.3.2 Barvení fluorochromy pro fluorescenční mikroskopii

Pro fluorescenční mikroskopii barvíme preparáty směsí auraminu a rhodaminu. Fixace probíhá v horkovzdušném sterilizátoru 10 minut při teplotě 105 °C, nebo je možná fixace plamenem stejná jako při fixaci preparátů barvených podle Ziehl-Neelsena. Samotné barvení roztokem fluorochromů probíhá 10–15 minut bez zahřívání, následně je barvivo slito a preparát opláchnut malým proudem tekoucí vody. Odbarvujeme kyselým alkoholem 5 minut a znovu opláchneme vodou. K dobarvení používáme roztok kyselého fuchsinu obsahující manganistan draselný, který necháme působit 2 minuty. Poté preparát opláchneme a usušíme (složení barviv je uvedeno v příloze č. 2) (Amlerová a kol, 2015, online; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

K hodnocení mikroskopického preparátu obarveného fluorochromy používáme binokulární fluorescenční mikroskop se suchým objektivem. Celkové zvětšení je 160–400x. Po celé ploše preparátu se meandrovitým pohybem vyšetří 25 zorných polí. Na temně červeném pozadí hledáme žlutozeleně až stříbrně zářící tyčinky. Zvláště při prvním záchytu je vhodné použít ke kontrole morfologie tyčinek imerzní objektiv a speciální imerzní olej pro fluorescenční mikroskopii. Při odečítání výsledku postupujeme podle tabulky č. 3. Některé buněčné substance se mohou barvit podobně jako ART, proto je při pochybnostech vhodné nátěr odbarvit kyselým alkoholem a znovu obarvit podle Ziehl-Neelsena (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

Tabulka č. 3 Hodnocení nálezu ART ve fluorescenční mikroskopii

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

Zdroj: Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998.

Imerzní objektiv mikroskopu se po odečtení každého preparátu utírá suchou gázou, kvůli případné kontaminaci dalšího odečítaného preparátu acidorezistentními tyčkami. Odečtené pozitivní preparáty se naloží do histologické kyvety s xylolem, aby se

zbavily imerzního oleje. V xylolu jsou ponořeny cca 5 minut a následně se nechají uschnout. Všechny nově pozitivní nálezy se ihned telefonicky hlásí odesílajícímu oddělení nebo lékaři. Ostatní výsledky jsou odeslány na příslušné oddělení nejpozději do 48 hodin od přijetí materiálu. Všechny preparáty jsou uchovávány až do konce mikrobiologického vyšetření a kompletního uzavření výsledku (Amlerová a kol, 2015, online; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Votava, 2000)

Mikroskopické vyšetření je pouze doplňkové a využívá se zejména pro jeho rychlost. Nález ART v nátěru nemusí nutně znamenat diagnózu tuberkulózy. Nalezené ART mohou být patogeneticky nevýznamné nebo mohou být snadno zaměněny s jinými bakteriálními rody (např. rodem *Nocardia*, *Rhodococcus* nebo *Corynebacterium*). Avšak ART nalezené v likvoru jsou natolik závažné, že je třeba ihned nasadit antibiotickou léčbu. U pacientů s nálezem ART ve sputu musíme pomýšlet na to, že mohou být velmi nebezpečným zdrojem mykobakterií pro okolí, hlavně kvůli snadnému přenosu (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Votava, 2000).

3.4 Kultivační průkaz mykobakterií

Další možnou metodou k diagnostickému průkazu mykobakterií je kultivace. Sterilně odebrané vzorky, například likvor nebo bioptický materiál, lze kultivovat rovnou, bez předchozí úpravy. Většina ostatních vzorků obsahuje další nespecifickou mikroflóru, která by mykobakterie přerostla a kultivace by byla znehodnocena. Proto se provádí tzv. dekontaminace neboli moření vzorku, viz výše. Mořením je vzorek taktéž homogenizován a ztekucován, mykobakterie se pak lépe uvolňují z mucinu. Před kultivací je vzorek rovněž koncentrován centrifugací nebo precipitací (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Votava, 2000).

3.4.1 Kultivační půdy

Kultivační vyšetření vzorku na přítomnost mykobakterií je časově náročné, z důvodu jejich pomalého růstu. Oproti mikroskopickému vyšetření je však mnohem citlivější. Pro pozitivní kultivační nález je minimální koncentrace mykobakterií 10^2 až 10^3 v 1 ml vyšetřovaného materiálu (Křepela, 1995). Vzorky pro kultivační průkaz ART se zpravidla očkují na 3–4 různé kultivační půdy. Využívány jsou jednak půdy pevné, a

to půda Löwenstein-Jensenova (L-J) a půda Ogawova a jednak půdy tekuté – Šulova půda a Baničova půda.

Pevné půdy se vyznačují obsahem vaječné masy. Ta je připravována z čerstvých vajec (použije se asi 22 vajec pro přípravu 1 l vaječné masy). Vejce jsou postupně přidávány do nádoby, kde se třepou se skleněnými perličkami nebo mixují ponorným mixérem, dokud nevznikne homogenní vaječná suspenze. Celý postup probíhá za sterilních podmínek. L-J půda obsahuje asparagin, glycerin, škrob a některé soli. Půda má ve výsledku slabě zelenou barvu, díky přidavku vodného roztoku malachitové zeleně. Po dokonalém promísení a případném přefiltrování se tato směs rozplňuje po 5 ml do vysokých zkumavek. Srážení půd probíhá ve speciálním srážecím aparátu nebo v Arnoldově přístroji, který využívá proudící páru o teplotě 85 °C. Uzavřené zkumavky jsou do přístroje vkládány v šikmé poloze, aby se zvětšila očkovací plocha půdy. Správně připravená půda má zrcadlově lesklý povrch bez bublinek. L-J půda však není vhodná pro kultivaci *M. bovis*. Glycerin obsažený v této půdě inhibuje jeho růst, proto se pro účel kultivace tohoto mykobakteriálního druhu do půdy přidá místo glycerinu pyrohroznan sodný. Ogawova půda je na svou přípravu jednodušší než L-J půda. Neobsahuje asparagin, ale glutamát. K základnímu roztoku je taktéž přidána vaječná masa, glycerin a malachitová zeleň. Stejně jako L-J půda je rozlévána do zkumavek a srážena v Arnoldově přístroji. Obě tyto půdy se svými vlastnostmi vhodně doplňují (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Votava, 2000).

Tekuté půdy, na rozdíl od pevných, obsahují nativní bílkovinu, protože se obohacují sterilním hovězím sérem. Šulova tekutá půda ve svém základním roztoku obsahuje mimo jiné glycerin a l-alanin a obohacuje se kaseinovým hydrolyzátem. Je dodávána komerčně jako koncentrát, který se ředí sterilní destilovanou vodou. Při přípravě této půdy je nutné pracovat v boxu pro aseptickou práci, zkumavky jsou rozplňovány po 5 ml za dodržení striktně sterilních podmínek. Tekutá půda Baničova obsahuje l-alanin a je do ní přidáván penicilin. Při přípravě ji chráníme před kontaminací, stejně jako půdu Šulovu (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Votava, 2000). Složení základních roztoků jednotlivých druhů kultivačních půd je uvedeno v příloze.

Půdy se očkují sterilní Pasteurovou pipetou 0,2 ml homogenizovaného sedimentu vzorku. Každý vzorek je naočkován na 3–4 půdy, většinou bývá kombinace tekutých i

pevných půd. Pevné vaječné půdy jsou očkované pouze na jejich povrch. Některé vzorky, jako například vzorky z kůže nebo abscesů vyžadují speciální kultivaci. Očkují se na dvě řady médií, z nichž jedna je uložena v komorovém termostatu při 28–30 °C, kvůli *M. marinum* a *M. chelonae*. Druhá řada médií se inkubuje při 35–37 °C, tak jako ostatní vzorky. Naočkované pevné půdy se uchovávají uzavřené v takové poloze, aby inokulum zakrývalo celou plochu půdy minimálně na 24 hodin. Všechny zkumavky jsou řádně označené protokolárním číslem a vzorky od jednoho pacienta jsou sepnuty gumičkou do jednotlivých svazků. Celková doba inkubace na pevných půdách trvá obvykle 9, případně 12 týdnů. Během doby kultivace nesmí být překročena teplota 40 °C, vzduch musí v termostatu správně cirkulovat (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Votava, 2000).

První odečítání probíhá po třech týdnech od začátku inkubace. Vysokoškolský pracovník, který odečítání provádí, vybere půdy s narostlými mykobakteriálními koloniemi a zhodnotí je podle schématu uvedeném v tabulce č. 4. Na půdách se objevují kolonie rychle rostoucích i některých dalších druhů mykobakterií. U pozitivních kultur se provede jejich identifikace a průběžné výsledky se odesílají na příslušné oddělení. Zároveň se také vyřazují vzorky kontaminované (po mikroskopické kontrole), spolu s žádostí o opakování vyšetření. Po šesti týdnech inkubace se hodnotí a zároveň odesílají všechny vzorky. Pozitivní půdy se identifikují, u negativních pokračuje kultivace další tři týdny. Sdělení dalších výsledků probíhá pouze v případě pozitivního nálezu. Po 9 týdnech se inkubace obvykle ukončí, výjimkou mohou být vzorky, u kterých byly v mikroskopickém preparátu nalezeny acidorezistentní tyčky. U těchto vzorků je vhodné kultivaci prodloužit ještě o 3 týdny. Kvůli urychlení vyšetření se v některých laboratořích můžou vzorky odečítat navíc již po dvou týdnech. Zejména se vyřazují kontaminované půdy, odečítají se první záchyty rychle rostoucích mykobakterií nebo vzorky, které byly pozitivní na přítomnost ART v mikroskopickém preparátu (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Votava, 2000).

Tabulka č. 4 Hodnocení pozitivních kultur při kultivačním vyšetření

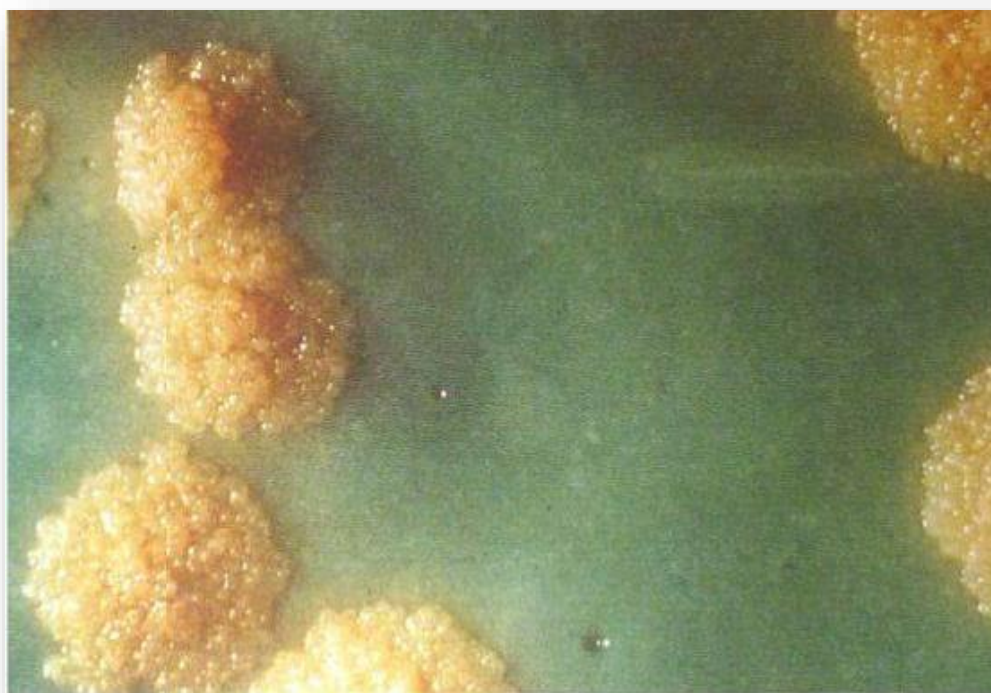
1-9	ojedinělé kolonie, uvádí se jejich počet
+	10–20 kolonií
++	21–100 kolonií
+++	nepočítatelný počet kolonií, blanka na povrchu tekuté půdy, splývající růst na vaječné půdě

Zdroj: Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998.

3.4.2 Vzhled kolonií

Jeden z klinicky nejvýznamnějších druhů mykobakterií, *M. tuberculosis*, roste na vaječných půdách v podobě drsných květákovitých kolonií nažloutlé barvy. Kolonie mají nepravidelný okraj a jejich konzistence je drolivá (eugonický růst). Růst *M. tuberculosis* na L-J půdě můžeme vidět na obrázku č. 3. Naopak *M. bovis* roste dysgonicky. Jeho kolonie jsou malé, sotva viditelné, jejich povrch je hladký a nepigmentovaný. Ostatní druhy mykobakterií tvoří velmi rozmanité kolonie. V tekutých půdách se tuberkulózní mykobakteria jeví jako krupicovitý sediment, který nelze roztřepat (Votava, 2000).

Obrázek č. 3 Kolonie *M. tuberculosis* na L-J půdě



Zdroj: E. W. Nester, C. E. Roberts, M. T. Nester: Microbiology – a human perspective. WM. C. Brown Publishers, 1995, s. 482, ISBN 0-697-12760-5.

3.4.3 Metody urychlené kultivace

V současné době jsou stále více používané tzv. urychlené kultivační postupy, jejichž principem je stanovení metabolických produktů mykobakterií, které jsou během jejich růstu uvolňovány do tekutých půd. Pozitivní vzorky jsou detekovány počítačem již za 10–14 dnů. Další přístroje fungují na bázi detekce úbytku kyslíku, který je mykobakteriemi spotřebováván v průběhu jejich růstu. (Votava, 2003; Ptáková, 2011).

Příkladem vyšetření založeného na měření metabolických produktů mykobakterií je systém BACTEC 460 TB. Testovaný vzorek je inokulován pomocí injekční stříkačky do speciální diagnostické lahvičky, obsahující obohacené Middlebrookovo tekuté médium 7H12B. K médiu je přidána kyselina palmitová, značená radioizotopem ^{14}C . Tento substrát je za přítomnosti živých mykobakterií metabolizován na $^{14}\text{CO}_2$. Radioaktivní plyn se hromadí nad médiem a při dosažení určité koncentrace se výsledek automaticky zaznamená jako pozitivní (Homolka a Votava, 2003; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

Na principu měření CO_2 slouží také neradiometrický přístroj MB/BacT. Rozdíl od předchozí metody spočívá ve způsobu detekce CO_2 , která probíhá kolorimetricky. Na dně kultivačních lahviček jsou zabudovány terčíky, které s přibývajícím množstvím oxidu uhličitého mění svou barvu. Inkubační skříně přístroje jsou vybaveny senzory, jež světelně a zvukově hlásí změny barvy jednotlivých terčíků. Další novější neradiometrické přístroje využívají obdobného způsobu detekce, s rozdílem měření fluorescence (Homolka a Votava 2003; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

Kultivační systém MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) je systém, který měří spotřebu kyslíku. Biologický vzorek je plněn do speciálních lahviček, vybavených oxygenovým senzorem. Jako kultivační půda je využíváno selektivní Middlebrookovo 7H12B médium a na lahvičky je pomocí silikonové zátky upevněn fluorescenční indikátor. Výsledná intenzita fluorescenčního záření je měřena UV transluminátorem a je přímo úměrná spotřebě kyslíku, tedy množství přítomných mykobakterií (Kozáková, 2006; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.5 Identifikace izolovaných kmenů mykobakterií

Izolované kmeny mykobakterií je potřeba identifikovat. Cílem identifikace je hlavně odlišení obligatorně patogenních mykobakterií (nejčastěji mykobakterie tuberkulózního komplexu) od netuberkulózních mykobakterií (NTM). Tomuto vyšetření podléhají všechny nově izolované kmeny, které by měly být určeny na úroveň druhu mykobakteria. (Amlerová a kol, 2015, online; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998). Porovnání jednotlivých metod identifikace je uvedeno v tabulce č. 6.

3.5.1 Screeningové testy

Předběžně se vzorky hodnotí na základě screeningových testů. Na pevných i tekutých půdách pozorujeme makroskopický vzhled kolonií. V tekutých půdách rozlišujeme sediment nebo zákal, některé kolonie rostou v podobě blanky na povrchu půdy. Na pevných i tekutých půdách hodnotíme velikost kolonií, jejich povrch a konzistenci. Vaječné půdy nám umožňují rozlišit eugonický (typický pro *M. tuberculosis*) a dysgonický růst (typický pro *M. bovis*). Identifikovat jednotlivé druhy mykobakterií nám pomáhá také pigmentace kultur (Votava, 2000; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

V mikroskopickém preparátu kontrolujeme přítomnost ART a tím potvrzujeme rod *Mycobacterium*. Mikroskopická morfologie musí být ověřena alespoň z jedné půdy izolovaného kmene. V mikroskopu hodnotíme tvar, uspořádání a velikost ART, tvorbu provazců, vláken nebo shluků a přítomnost granul. Zároveň posuzujeme čistotu kultury, pro další testování je nutno získat kulturu s přítomností pouze jednoho druhu ART. Mikroskopické vyšetření považujeme pouze za orientační, neboť většina mykobakterií nemá specifické morfologické znaky (Amlerová a kol, 2015, online; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

Jako další screeningové testy se využívají metody založené na odlišných biochemických vlastnostech jednotlivých druhů mykobakterií. Mezi základní biochemické testy patří produkce niacinu, redukce nitrátů a schopnost růstu na půdách s přísadkou hydrazidu kyseliny thiofen-2-karbonové (TCH). Screeningově se u každého nově izolovaného kmene mykobakterií testuje také citlivost na antituberkulotika (AT) (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

V posledních letech se využívá imunochromatografický test na průkaz proteinu MPT 64, jehož produkce je specifická pro druhy komplexu *M. tuberculosis* (Arora, 2015).

3.5.2 Niacinový test

Na základě schopnosti tvořit niacin odlišujeme screeningově *M. tuberculosis* od ostatních druhů mykobakterií. Niacin produkovaný mykobakteriemi tvoří deriváty s kyanidy a za přítomnosti anilinu je tvořeno žluté zbarvení. Pozitivní výsledek tohoto testu sledujeme u *M. tuberculosis* a některých podkmenů *M. bovis* BCG. Možná tvorba niacinu je zjištěna také u *M. microti*, *M. chelonae* a u některých kmenů *M. africanum* či *M. simiae*. *M. bovis* a ostatní mykobakterie niacin netvoří, výsledek je negativní (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.5.3 Redukce nitrátů

Enzymatické vlastnosti některých mykobakterií zajišťují redukci nitrátů na nitrity, které jsou prokazovány detekčními činidly jako červená sloučenina. Pozitivní vzorky se projeví jasně červeným zbarvením, negativní nikoliv. Kontrola negativy testu spočívá v přidání zinkového prachu, kdy se negativní výsledek barví červeně. Pozitivitu tohoto testu prokazuje *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* a *M. szulgai*. Typicky negativní výsledek nacházíme v přítomnosti *M. bovis*, *M. avium-intracellulare*, *M. xenopi*, *M. chelonae* nebo *M. simiae*. U *M. bovis* BCG, *M. scrofulaceum* a *M. marinum* může být výsledek variabilní (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.5.4 Citlivost na TCH

Tento test slouží zejména k odlišení *M. tuberculosis* a *M. bovis*. Vzorek mykobakteriální kultury se naočkuje na vaječnou půdu s přídatkem 1 mg TCH a současně na kontrolní půdu bez TCH. Růst *M. bovis* je za přítomnosti TCH inhibován. Na půdě s TCH neroste ani *M. bovis* BCG ani *M. africanum*. Naopak *M. tuberculosis* a jiná mykobakteria se na půdě s přídatkem TCH pomnožují (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.5.5 Test fotochromogenity

Některé druhy mykobakterií vykazují schopnost fotochromogenity. Fotochromogenní mykobakteria, *M. kansasii* a *M. marinum*, obsahují nebarevné prekurzory, které se po ozáření viditelnou částí světla a za přítomnosti vzduchu mění na

žlutě až oranžově zbarvené deriváty beta karotenu. Kultivace probíhá ve dvou sériích. První série zkumavek se kultivuje zabalená do tmavého papíru, druhá se ponechá nezabalená. Po třech týdnech inkubace se nezabalené zkumavky vystavují na dvě hodiny účinku světelného záření. Fotochromogenita je prokázána, pokud mají ozářené zkumavky žlutou pigmentaci kolonií, ve srovnání s neozářenými, ve kterých rostou kolonie krémové barvy (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

3.5.6 Další metody identifikace založené na průkazu biochemických a růstových vlastností mykobakterií

Kromě těchto testů se k druhovému určení mykobakterií využívají ještě další testy založené na průkazu biochemických a růstových vlastností. Patří mezi ně například:

Růst při různých teplotách

Redukce železitých iontů

Růst na půdě s 5% chloridem sodným (NaCl)

Růst na půdě s 0,5 mg/ml hydroxiaminu (HA)

Růst na půdě s 0,5 mg/ml p-nitrobenzoátu sodného (PNB)

Růst na půdě s 1 % deoxycholátu sodného (DS)

Hydrolyza Tweenu 80

Průkaz arylsulfatázy

Průkaz kyselé fosfatázy

Průkaz beta-galaktosidázy

Průkaz diaminooxidázy

Průkaz acylamidáz

Degradace p-aminosalicylátu

Tvorba kyseliny ze sacharidů

(Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998)

3.5.7 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie

„Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI – TOF MS) je založena na srovnání hmotnostního spektra biomolekul (hlavně proteinů) vyšetřovaného izolátu s hmotnostním spektrem známého mikroorganismu“ (Melter a Malmgren, 2014, s. 126).

Pomocí hmotnostní spektrometrie jsou biomolekuly nejprve ionizovány a separovány. Měří se čas letu částic a dochází k vytváření hmotnostního spektra, které se nakonec srovnává s databází známých hmotnostních spekter, specifických pro každý mikroorganismus. Tato metoda zatím není pro identifikaci mykobakterií tak spolehlivá, jako pro ostatní bakteriální druhy, je zde nutná příprava kmene tzv. extrakcí (Amlerová, 2014). Výhodou je její rychlost – vzorek může být identifikován během několika minut (Melter a Malmgren, 2014; Amlerová a kol, 2015, online).

3.6 Molekulárně genetické metody

V posledních letech se v souvislosti s rozvojem molekulární genetiky stále více využívají k detekci *M. tuberculosis* ve vzorcích právě molekulárně genetické metody. Nejprínosnější jsou metody amplifikační, konkrétně PCR (polymerázová řetězová reakce). Tyto metody jsou velmi senzitivní i specifické. Provedení je velice rychlé, do několika hodin. U diagnostiky tuberkulózy je nutné vždy tyto metody doplnit o vyšetření kultivační, které je v každém případě nepominutelné.

Molekulárně genetické metody využívají detekci specifických sekvencí nukleových kyselin, které jsou namnožené amplifikací. Tento amplifikovaný produkt je detekován hybridizací se specifickými sondami (Ptáková, 2011).

3.7 Stanovení citlivosti na antituberkulotika

Test citlivosti na základní antituberkulotika (AT) se provádí u každého nově izolovaného kmene mykobakterií tuberkulózního komplexu, na požádání klinika se testují i podmíněně patogenní druhy mykobakterií. Mezi základní druhy AT řadíme isoniazid (INH), streptomycin (STM), rifampicin (RIF), pyrazinamid (PZA) a etambutol (EMB). Pokud u pacienta nedochází ke zlepšení stavu a je laboratorní nález pozitivní i po 3 měsících od zahájení léčby, musí se vyšetření citlivosti opakovat. Při přetrvávající rezistenci se stanovení citlivosti rozšiřuje i jinými antibiotiky a antituberkulotiky, jedná se především o fluorochinolony, rifabutin, etionamid, klaritromycin, aminoglykosidy, capreomycin, clofazimin a cykloserin. K testování lékové citlivosti je využívána tzv. proporční metoda dle Canettiho na vaječných půdách, k moderním a rychlejším metodám řadíme testování v automatických systémech typu Bactec nebo molekulárně genetické vyšetření genů zodpovědných za lékovou rezistenci. Další možností je stanovení tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC), která se používá především u rezistentních kmenů *M. tuberculosis* jako doplňková metoda (Homolka a Votava, 2012; Amlerová a kol, 2015, online).

3.7.1 Proporční metoda dle Canettiho

Testování lékové citlivosti mykobakterií se liší od běžného testování ostatních bakteriálních druhů. Podstatou tohoto stanovení je srovnání růstu mykobakteriálního kmene na půdě bez AT s růstem na půdě s tzv. kritickou koncentrací léku. Kritickou koncentraci můžeme definovat jako minimální koncentraci, která inhibuje "divoké kmeny", které se nikdy předtím nedostaly do styku s daným lékem. Zároveň ale tato koncentrace neumožňuje inhibici izolátů získaných od pacientů, jež nereagují na léčbu (Votava, 2000; Amlerová a kol, 2015, online).

Kultivace probíhá na vaječných L-J půdách, které obsahují takové množství příslušného AT, aby byla zajištěna kritická koncentrace. Přehled kritických koncentrací u základních AT je znázorněn v tabulce č. 5. Takto připravené půdy jsou obvykle dodávány komerčně (Amlerová a kol, 2015, online).

Tabulka č. 5 Přehled kritických koncentrací u základních AT

Druh AT	Kritická koncentrace v miligramech na liter (mg/l)
INH	0,2
STM	4
RIF	40
EMB	2
PZA	400

Zdroj: Amlerová a kol, 2015, online
http://www.splm.cz/dokumenty/NSVP7_navrh1.pdf

Inkubace probíhá 3–4 týdny, poté se odečítá výsledek v tzv. kritických proporcích (x%). Kritická proporce udává procento rezistentních zárodků a vypočítá se podle následujícího vzorce:

$$X\% = \frac{a \cdot 100}{b},$$

kde **a** je rovno počtu kolonií vyrostlých na půdě s kritickou koncentrací léku, a **b** udává počet kolonií vyrostlých na kontrolní půdě o stejném ředění (Amlerová a kol, 2015, online; Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998).

Testovaný kmen je hodnocen jako citlivý, pokud je x% menší nebo roven 1%. V případě, že je x% větší než 1 %, vyhodnotíme kmen jako rezistentní. Relevantní výsledek je možné vyhodnotit pouze tehdy, je-li v kontrolní půdě přítomno minimálně 20 narostlých kolonií. V opačném případě je třeba stanovení opakovat s použitím většího množství inokula (Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, 1998; Amlerová a kol, 2015, online).

3.8 Nepřímá diagnostika tuberkulózy

V mykobakteriologické diagnostice se uplatňuje i diagnostika nepřímá, ale je omezená pouze na průkaz onemocnění způsobených *M. tuberculosis*. Přínosné jsou tzv. metody IGRA (Interferon Gamma Release Assay). Principem je stanovení množství interferonu gama, který je produkován efektorovými T-lymfocyty při styku s tuberkulózními antigeny. Testy byly vyvinuty k detekci latentní formy tuberkulózy, ale

lze je využít i pro detekci aktivní formy nemoci. Patří mezi ně metody QuantiFeron TB Gold a T-SPOT TB (Amlerová, 2016).

Průkaz protilátek se již v diagnostice nevyužívá, WHO označila tuto metodu jako nevhodnou a zavádějící pro diagnostiku tuberkulózy (www.who.int, 2015, on-line).

Tabulka č. 6 Porovnání jednotlivých metod průkazu mykobakterií

Laboratorní metoda	Biologický materiál	Doba do získání výsledku	Hodnocení – průkaz
Mikroskopický preparát	Všechny druhy materiálů; moč, krev, menstruační krev, stolice na vyžádání	2 h	acidorezistentní tyčky
Kultivační vyšetření	Všechny druhy materiálů	2–9 týdnů	živá mykobakteria
Metabolická kultivace (např. Bactec)	Všechny druhy materiálů	několik dnů až 6 týdnů	živá mykobakteria
Molekulárně genetické metody (např. MTD, PCR)	Všechny druhy materiálů kromě krve	6–8	genetický materiál specifický pro M. tuberculosis komplex
QuantiFERON	Krev	24 h	interferon gama (IF N- γ) stav buněčné imunity

Zdroj: Ptáková, 2011 <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/11/06.pdf>

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat v teoretické části ucelený přehled možností laboratorní diagnostiky mykobakteriálních onemocnění. Dále v praktické části zpracovat analýzu vzorků klinického materiálu vyšetřených v mykobakteriologické laboratoři za dané časové období včetně přehledu záchytu jednotlivých mykobakteriálních agens.

5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

V praktické části byly zkoumány vzorky klinického materiálu vyšetřené v Laboratoři pro dg. mykobakterií Ústavu mikrobiologie Fakultní nemocnice v Plzni od 1. 1. 2017 do 31. 12. 2017. Vzorky pocházely především od pacientů Fakultní nemocnice z ambulantní i lůžkové části, dále z Léčebny tuberkulózy a respiračních nemocí v Janově, dále z ambulantních zařízení odborných plicních lékařů a také z ambulantních i lůžkových zařízení jiných specialistů. Bylo vyšetřeno celkem 7419 vzorků různých druhů klinického materiálu.

6 METODIKA PRÁCE

Vzorky klinického materiálu byly dodány na příjem laboratoře pro dg. mykobakterií, byly zkontrolovány a každému bylo přiděleno jedinečné protokolové číslo. U sputa byla zhodnocena jeho kvalita, např. hnisavé, krvavé, sliny apod.

Všechny vzorky byly dekontaminovány metodou s N-acetyl-L-cysteinem. Dekontaminační proces obsahoval přidání roztoků N-acetyl-L-cysteinu s NaOH, 5% Tweenu 80 a fosfátového pufru do vzorku spolu s průběžným třepáním a následnou centrifugací 30 minut při otáčkách 3500 za min. Po slití supernatantu se k sedimentu přidal čtvrtý roztok – fyziologický roztok s Tweenem 80. Následovala resuspenzace vortexem, resp. propláchnutí Pasteurovou pipetou.

Ze všech vzorků materiálu kromě močí a LV byl zhotoven mikroskopický preparát. Na podložní sklíčko se nakapaly 1–2 kapky dekontaminovaného vzorku, nechaly se zaschnout při pokojové teplotě a následně se preparát fixoval ve sterilizátoru po dobu 15 minut při teplotě 100°C. Před vlastním barvením se ještě 3x preparát protáhl plamenem. Všechny zhotovené preparáty se screeningově barvily fluorescenční metodou, která spočívala v postupném nanesení 3 roztoků. Fluorescenční barvení A preparát obarvilo, roztok B odbarvil všechny struktury mimo ART a roztok C dobarvil pozadí preparátu. Do prohlížení ve fluorescenčním mikroskopu byly preparáty uloženy ve tmě.

Další část dekontaminovaného vzorku byla očkována na sadu kultivačních půd ve složení BBL MGIT s tekutým médiem Middlebrook 7H12B pro detekční systém *BACTEC® MGIT™ 960* (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) v množství 0,5 ml a na vaječné kultivační půdy Löwenstein-Jensen a Ogawa (TRIOS, Olomouc, Česká republika) v množství 0,2–0,5 ml. Po naočkování na pevné půdy se vzorek rozlil po celém povrchu půdy, byl uložen do šikmého stojanu a vložen do termostatu s teplotou 37 °C na 24 až 72 hodin.. Poté byly půdy uloženy do boxu podle probíhajícího kalendářního týdne opět do termostatu o teplotě 37 °C. V případě indikace kultivace i jiných teplotách lékařem byly naočkovány další půdy a kultivovány v teplotě 30 °C nebo 42 °C. Zkumavka BBL MGIT byla vložena do přístroje BACTEC MGIT 960. Zbytky vzorků byly likvidovány až po uzavření výsledků mikroskopie. Kultivace byla odečítána standardně po 3, 6 a 9 týdnech, kultivace v Bactec MGIT probíhala automaticky, pozitivita vzorků byla hlášena ihned, kultivace negativních vzorků byla ukončena po 42 dnech.

Izolované kmeny byly identifikovány nejprve v rámci rozlišení *M. tuberculosis* komplexu imunochromatografickým testem MPT 64. V rámci *M. tuberculosis* komplexu pak niacinovým testem a růstem v přítomnosti TCH. U netuberkulózních druhů byla k identifikaci použita metoda MALDI TOF MS.

7 VÝSLEDKY

Za období od 1. 1. 2017 do 31. 12. 2017 bylo vyšetřeno celkem 7419 vzorků. V tabulce č. 7 je uveden přehled kategorií zdravotnických zařízení, která mykobakteriologické vyšetření indikovala a také kategorie typů klinických vzorků.

Tabulka č. 7 Druhy klinického materiálu a počty vzorků v jednotlivých typech zdravotnických zařízení

Indikující subjekt	Typ klinického materiálu									Celkem
	Spu- tum	Jiný respirační materiál (BAL)	LV	Moč	Hnis	Hrudní punktát	Likvor	Uzlina	Jiný materiál	
Ambulance ne TBC	115	0	0	41	5	9	0	1	21	192
Lůžka ne TBC	322	99	3	23	16	129	5	5	56	658
Léčebna TRN	2129	2	32	20	5	2	0	0	51	2241
Lůžka TRN	1102	206	14	5	0	150	0	0	15	1492
Ambulance TRN	1898	716	7	45	0	129	0	1	22	2818
Oddělení patologie	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18
Celkem	5566	1023	56	134	26	419	5	7	183	7419

Ze všech vyšetřených vzorků bylo mykobakteriální agens zachyceno v 508 případech v různých materiálech – přehled je uveden v tabulce č. 8. U některých pacientů byla pozitivita zachycena opakovaně, proto je celkový počet pozitivních pacientů menší, než počet vzorků – viz tabulka č. 9.

Přehled pacientů s pozitivním nálezem je rozdělen také podle klinické významnosti nálezu. V tabulce č. 9 jsou nálezy klinicky významné, v tabulce č. 10 pak nálezy bez klinické významnosti. U těchto klinicky nevýznamných nálezů byl u každého pacienta pozitivní právě jen jeden vzorek.

Tabulka č. 8 Počet pozitivních vzorů podle mykobakteriálních druhů a typu materiálu

Mykobakteriální druh	Druh vyšetřovaného materiálu	Počet pozitivních vzorků
<i>M. tuberculosis</i>	Sputum	377
	BAL	13
	Uzlina	2
	Pleurální výpotek	2
	Jiný materiál	10
<i>M. avium</i>	Sputum	56
	Uzlina	1
	Jiný materiál	2
<i>M. intracellulare</i>	Sputum	9
	BAL	1
	Ostatní materiál	1
<i>M. kansasii</i>	Sputum	16
	Jiný materiál	2
<i>M. fortuitum</i>	Sputum	5
<i>M. xenopi</i>	Sputum	4
	Jiný materiál	2
<i>M. gordonae</i>	Sputum	2
<i>M. marinum</i>	Jiný materiál	1
<i>M. peregrinum</i>	Sputum	2
Celkem		508

Tabulka č. 9 Počet pacientů s pozitivním výsledkem podle jednotlivých druhů mykobakterií – klinicky významné nálezy

Mykobakteriální druh	Počet pozitivních pacientů
<i>M. tuberculosis</i>	78
<i>M. avium</i>	25
<i>M. intracellulare</i>	6
<i>M. kansasii</i>	3
<i>M. fortuitum</i>	4
<i>M. xenopi</i>	2
<i>M. gordonae</i>	1
<i>M. marinum</i>	1
<i>M. peregrinum</i>	2
Celkem	122

Tabulka č. 10 Počet pacientů s pozitivním výsledkem podle jednotlivých druhů mykobakterií – klinicky nevýznamné nálezy

Mykobakteriální druh	Počet pozitivních pacientů
<i>M. gordonae</i>	10
<i>M. paragordoniae</i>	5
<i>M. fortuitum</i>	6
<i>M. peregrinum</i>	3
<i>M. porcinum</i>	1
<i>M. chimaera</i>	2
Celkem	27

8 DISKUZE

Ve sledovaném souboru bylo vyšetřeno 7419 vzorků klinického materiálu. Spádová oblast laboratoře je poměrně velká, laboratoř prakticky vyšetřuje mykobakterie pro celý Plzeňský kraj a dále i pro některá zdravotnická zařízení z jiných oblastí. Při pozitivitě 508 vzorků je procento pozitivních nálezů 6,85. Tento výsledek odpovídá situaci ve výskytu tuberkulózy v ČR, který je velmi nízký, v posledních letech je incidence 4,9 nových případů na 100 000 obyvatel (ÚZIS, 2016).

Nejvíce vyšetřovaných vzorků bylo z dolních cest dýchacích. Nejčastější forma mykobakteriálních onemocnění je forma plicní, proto i tento materiál je nejčastější. Zároveň je mykobakteriologické vyšetření vhodné i tam, kde je podezření na tuto etologii i jen velmi malé, ale kde je získán vzorek jedinečný, tedy např. z invazivních odběrů. Tak jsou vyšetřovány materiály jako např. likvory, tkáně, uzliny.

508 pozitivních vzorků bylo zachyceno u 78 osob, netuberkulózní mykobakteria s klinickým významem celkem u 44 osob. Při laboratorní diagnostice mykobakteriálních onemocnění se doporučuje vyšetřování série vzorků, tedy minimálně tří. Toto doporučení je vydáno na základě faktu, že k vylučování mykobakterií při aktivním onemocnění nedochází plynule, ale intermitentně, a tedy z jednoho vzorku by nemusela být zachycena. Dále se pozitivní pacienti vyšetřují opakovaně z důvodu monitorace úspěšnosti léčby.

V několika případech byla kultivačně zachycena netuberkulózní mykobakteria, jejichž přítomnost byla nakonec hodnocena jako nález klinicky nevýznamný. Tato mykobakteria se do vzorku mohla dostat např. jako kontaminace z prostředí nebo mohla být přítomna v dýchacích cestách pacienta jako kolonizace. Pacientovi tento nález nepůsobil žádné obtíže a léčba nebyla nutná.

9 ZÁVĚR

Bakalářská práce je zaměřena zejména na shrnutí jednotlivých laboratorních metod, vedoucích ke správné diagnostice mykobakterií v biologických vzorcích. Včasná a přesná laboratorní diagnostika je klíčem k správnému určení onemocnění a následně tak k zahájení vhodné léčby.

Hlavní náplní práce mykobakteriologických laboratoří je průkaz mykobakterií tzv. tuberkulózního komplexu, jež způsobují tuberkulózu. Nutno podotknout, že toto infekční onemocnění stále patří mezi nemoci celosvětově nejrozšířenější. Nebezpečí hrozí hlavně v důsledku šíření mykobakteriálních kmenů, které jsou rezistentní na léčbu. Z těchto důvodů bychom měli tuberkulóze stále věnovat velkou pozornost.

První a druhá kapitola je věnována charakteristice bakteriálního rodu *Mycobacterium* a popisu jednotlivých klinicky nejvýznamnějších zástupců tohoto rodu. V kapitole následující je vypracovaný přehled laboratorních metod využívaných k diagnostice mykobakterií. V rámci kapitoly laboratorní diagnostiky jsou zde vypsány druhy biologického materiálu, které lze pro vyšetření použít, včetně možností jejich zpracování pro další vyšetření. Mezi nejčastěji využívané diagnostické postupy patří mikroskopický a kultivační průkaz mykobakteriálních agens. Zároveň se tyto metody stále považují za nejspolehlivější. Stále více využívanou metodou průkazu mykobakterií jsou molekulárně genetické metody, které mohou výrazně urychlit získání výsledku vyšetření. Kapitola popisuje rovněž postup identifikace izolovaných kmenů bakterií a stanovení jejich citlivosti k léčbě antituberkulotiky. Cílem bylo také provést stručné srovnání jednotlivých laboratorních metod, které je uvedeno v závěru kapitoly.

Naplněn byl rovněž cíl praktické části práce, kde je přehledně zpracováno vyhodnocení všech laboratorních nálezů z klinického materiálu za rok 2017. Výsledkem je shrnutí klinicky významných laboratorních nálezů a nálezů klinicky nevýznamných, které pacienta nijak neohrožují.

Informační zdroje:

1. AMLEROVÁ, Jana, Vendula ŠTUDENTOVÁ a Jaroslav HRABÁK (2014). *Identifikace izolátů Mycobacterium spp. pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie*. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 63, 2014/3:195-198
2. AMLEROVÁ, Jana, Pavel ČERMÁK, Jana SVOBODOVÁ, Vít ULMANN a Ilona ZEMANOVÁ (2015) *Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění: Národní standardní vyšetřovací postup* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: http://www.splm.cz/dokumenty/NSVP7_navrh1.pdf
3. AMLEROVÁ, Jana a Jaroslav HRABÁK (2016). *IGRA metody v rutinním provozu - Quantiferon®-TB Gold nebo T-SPOT®.TB?*, Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 65, 2016, č. 4, s. 246-248
4. ARORA, Jyoti, Gavish KUMAR, Ajoy Kumar VERMA a kol. (2015). *Utility of MPT64 Antigen Detection for Rapid Confirmation of Mycobacterium tuberculosis Complex*. J Glob Infect Dis. 2015 Apr-Jun; 7(2): 66–69. doi: 10.4103/0974-777X.154443
5. BEDNÁŘ, M., a kol. (1996). *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Triton, ISBN 8021011882.
6. Biological Library, [online] In BioLib.cz [cit. 2017-11-08]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxonsubtaxa/id477011/?subtaxcat=150>
7. DiaLab. *Laboratorní medicína* [online]. [cit. 2018-03-03]. Dostupné z: <http://www.dialab.cz>
8. *Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí* (1998) Praha: Státní zdravotní ústav, 1998. ISBN 8070711094.
9. HOMOLKA, Jiří a Vladimír VOTAVA (2003). *Tuberkulóza*, 3., vydání. Praha: Karolinum, Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 8024606305.
10. KOZÁKOVÁ, B. (2006) *Posouzení účinnosti metabolické kultivační rychlometody MGIT (manuální systém) pro záchyt mykobakterií ve srovnání s klasickou kultivační metodou* [online]. 2006 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/epidemiologie-clanek/posouzeni-ucinnosti-metabolicke-kultivacni-rychlometody-mgit-manualni-system-pro-zachyt-mykobakterii-ve-srovnani-s-3764?confirm_rules=1
11. KŘEPELA, Karel (1995). *Tuberkulóza dětí a dorostu a její diferenciální diagnostika*. Praha: Maxdorf-Jessenius, ISBN 8085912031.

12. NESTER, E. W., C. E. ROBERTS, M. T. NESTER (1995). *Microbiology – a human perspective*. WM. C. Brown Publishers, 1995, s. 482, ISBN 0-697-12760-5.
13. NETVAL, Miroslav (2004). *Mimoplicní tuberkulóza: hlavní lokalizace*. Praha: Grada, ISBN 8024706547.
14. PTÁKOVÁ, Miluška (2011). *Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterií* [online]. *Med. praxi* 2011; 8(11): 466-468. 24.10.2011 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/11/06.pdf>
15. SEHGAL, Alfica (2006). *Leprosy*. Philadelphia: Chelsea House Publishers, ISBN 9870791085028.
16. STANLEY, Michael W., Michelle J. HENRY-STANLEY a C. IBER (1991). *Bronchoalveolar lavage: cytology and clinical applications*. New York: Igaku-Shoin, 1991. ISBN 0-89640-189-8.
17. TOMÁŠEK, Václav (1938). *Bakteriologie*. Praha: Melantrich.
18. ÚZIS, Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2016. [online]. 2016 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: [file:///C:/Users/Jana/Downloads/tbc2016_cz%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Jana/Downloads/tbc2016_cz%20(1).pdf)
19. VOTAVA, Miroslav a kol. (2000). *Lékařská mikrobiologie II: přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 8021022728.
20. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 8090289665.
21. WHO, *WHO warns against the use of inaccurate blood tests for active tuberculosis* [online]. 2011 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2011/tb_20110720/en/

Příloha č. 1

Přehled mykobakteriálních druhů podle BioLib.cz (online)

1. *Mycobacterium abscessus* Kusonoki & Ezaki, 1992
2. *Mycobacterium africanum* Castets et al., 1969
3. *Mycobacterium agri* (ex Tsukamura, 1972) Tsukamura, 1981
4. *Mycobacterium aichiense* (ex Tsukamura, 1973) Tsukamura, 1981
5. *Mycobacterium alvei* Ausina et al., 1992
6. *Mycobacterium arupense* Cloud et al., 2006
7. *Mycobacterium asiaticum* Weiszfeiler et al., 1971
8. *Mycobacterium aurum* Tsukamura, 1966
9. *Mycobacterium austroafricanum* Tsukamura et al., 1983
10. *Mycobacterium avium* Chester, 1901
 - a. poddruh *Mycobacterium avium avium* Chester, 1901
 - b. poddruh *Mycobacterium avium paratuberculosis*
 - c. poddruh *Mycobacterium avium silvaticum* Thorel et al., 1990
11. *Mycobacterium boenickei* Schinsky et al., 2004
12. *Mycobacterium bohemicum* Reischl et al., 1998
13. *Mycobacterium bolletii* Adékambi et al., 2006
14. *Mycobacterium botniense* Torkko et al., 2000
15. *Mycobacterium bovis* Karlson & Lessel, 1970
16. *Mycobacterium branderi* Koukila-Kähkölä et al., 1995
17. *Mycobacterium brisbanense* Schinsky et al., 2004
18. *Mycobacterium brumae* Luquin et al., 1993
19. *Mycobacterium canariasense* Jiménez et al., 2004
20. *Mycobacterium canettii* D van Soolingen, et al., 1997
21. *Mycobacterium caprae* Aranaz et al., 2003
22. *Mycobacterium celatum* Butler et al., 1993
23. *Mycobacterium chelonae* Bergey et al., 1923
24. *Mycobacterium chimaera* Tortoli et al., 2004
25. *Mycobacterium chitae* Tsukamura, 1967
26. *Mycobacterium chubuense* (ex Tsukamura, 1973) Tsukamura et al., 1981
27. *Mycobacterium colombiense* Murcia et al., 2006
28. *Mycobacterium conceptionense* Adékambi et al., 2006
29. *Mycobacterium confluentis* Kirschner et al., 1992
30. *Mycobacterium conspicuum* Springer et al., 1996
31. *Mycobacterium cookii* Kazda et al., 1990
32. *Mycobacterium cosmeticum* Cooksey et al., 2004
33. *Mycobacterium diernhoferi* Tsukamura et al., 1983
34. *Mycobacterium doricum* Ausina et al., 1992
35. *Mycobacterium duvalii* Stanford & Gunthorpe, 1971
36. *Mycobacterium elephantis* Motomura, 1961
37. *Mycobacterium fallax* Lévy-Frébault et al., 1983
38. *Mycobacterium farcinogenes* Chamoiseau, 1973
39. *Mycobacterium flavescens* Bojalil et al., 1962
40. *Mycobacterium florentinum* Tortoli et al., 2005
41. *Mycobacterium fortuitum* Da Costa Cruz, 1938
42. *Mycobacterium frederiksbergense* Willumsen et al., 2001
43. *Mycobacterium gadium* Casal & Calero, 1974
44. *Mycobacterium gastris* Wayne, 1966
45. *Mycobacterium genavense* Böttger et al., 1993
46. *Mycobacterium gilvum* Stanford & Gunthorpe, 1971
47. *Mycobacterium goodii* Brown et al., 1999
48. *Mycobacterium gordonae* Bojalil et al., 1962
49. *Mycobacterium haemophilum* Sompolinsky et al., 1978
50. *Mycobacterium hassiacum* Schröder et al., 1997
51. *Mycobacterium heckeshornense* Roth et al., 2001
52. *Mycobacterium heidelbergense* Haas et al., 1998

53. *Mycobacterium hiberniae* Kazda et al., 1993
54. *Mycobacterium hodleri* Kleespies et al., 1996
55. *Mycobacterium holsaticum* Richter et al., 2002
56. *Mycobacterium houstonense* Schinsky et al., 2004
57. *Mycobacterium interjectum* Springer et al., 1995
58. *Mycobacterium intermedium* Meier et al., 1993
59. *Mycobacterium intracellulare* Runyon, 1965
60. *Mycobacterium kansasii* Hauduroy, 1955
61. *Mycobacterium komossense* Kazda & Muller, 1979
62. *Mycobacterium kubicae* Floyd et al., 2000
63. *Mycobacterium lacus* Turenne et al., 2002
64. *Mycobacterium lentiflavum* Springer et al., 1996
65. *Mycobacterium leprae* Hansen, 1874
66. *Mycobacterium lepraemurium* Marchoux & Sorel, 1912
67. *Mycobacterium lepromatosis* Xiang-Yang Han, M. D., 2008
68. *Mycobacterium madagascariense* Ausina et al., 1992
69. *Mycobacterium mageritense* Domenech et al., 1997
70. *Mycobacterium malmoense* Schroder & Juhlin, 1977
71. *Mycobacterium marinum* Aronson, 1926
72. *Mycobacterium microti* Reed, 1957
73. *Mycobacterium monacense* Reischl et al., 2006
74. *Mycobacterium montefiorensis* Levi et al., 2003
75. *Mycobacterium mucogenicum* Springer et al., 1995
76. *Mycobacterium murale* Vuorio et al., 1999
77. *Mycobacterium nebraskense* Mohamed et al., 2004
78. *Mycobacterium neoaurum* Tsukamura, 1972
79. *Mycobacterium neworleansense* Schinsky et al., 2004
80. *Mycobacterium nonchromogenicum* Tsukamura, 1965
81. *Mycobacterium obuense* (Tsukamura & Mizuno, 1971) Tsukamura & Mizuno, 1981
82. *Mycobacterium palustre* Torkko et al., 2002
83. *Mycobacterium paraafortuitum* Tsukamura et al., 1965
84. *Mycobacterium parascrofulaceum* Turenne et al., 2004
85. *Mycobacterium peregrinum* (ex Bojalil et al., 1962) Kusunoki & Ezaki, 1992
86. *Mycobacterium phlei* Lehmann & Neumann, 1899
87. *Mycobacterium pinnipedii* Cousins et al., 2003
88. *Mycobacterium porcinum* Tsukamura et al., 1983
89. *Mycobacterium pseudoshottsii* Rhodes et al., 2005
90. *Mycobacterium saskatchewanense* Turenne et al., 2004
91. *Mycobacterium scrofulaceum* Prissick & Masson, 1956
92. *Mycobacterium senegalense* (Chamoiseau, 1973) Chamoiseau, 1979
93. *Mycobacterium septicum* Schinsky et al., 2000
94. *Mycobacterium shimoidei* Tsukamura et al., 1975
95. *Mycobacterium shottsii* Rhodes et al., 2003
96. *Mycobacterium simiae* Karassova et al., 1965
97. *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan, 1889) Lehmann & Neumann, 1899
98. *Mycobacterium sphagni* Kazda, 1980
99. *Mycobacterium szulgai* Marks et al., 1972
100. *Mycobacterium terrae* Wayne, 1966
101. *Mycobacterium thermoresistibile* Tsukamura, 1966
102. *Mycobacterium triplex* Floyd et al., 1997
103. *Mycobacterium triviale* Kubica, 1970
104. *Mycobacterium tuberculosis* Zopf, 1883
105. *Mycobacterium tusciae* Tortoli et al., 1999
106. *Mycobacterium ulcerans* McCallum, Tolbert & Buckle in Fenner, 1950
107. *Mycobacterium vaccae* Bönicke & Juhasz, 1964
108. *Mycobacterium wolinskyi* Brown et al., 1999
109. *Mycobacterium xenopi* Schwabacher, 1959

Příloha č. 2 – Příprava a složení roztoků

Barvení dle Ziehl-Neelsena

Karbofuchsin:

Připraví se smísením přefiltrovaného roztoku A a B v poměru 1:10.

Roztok A:

- Fuchsin krystalický bazický 10 g
- Alkohol 96% nebo lihobenzin 100 ml

Roztok B:

- Fenol krystalický 50 g
- H₂O dest. 200 ml

Po rozpuštění se H₂O dest. doplní do 1000 ml

Odbarvovací roztok:

- 25% kyselina sírová
- H₂SO₄ konc. 100 ml
- H₂O dest. 300 ml nebo kyselý alkohol
- HCl koncentrovaná 3 ml
- Alkohol 96% nebo lihobenzin 97 ml

Dobarvovací roztok:

- 1% vodný roztok malachitové zeleně nebo methylenové modři. (1 g barviva rozpustit ve 100 ml H₂O dest.)

Barvení na fluorescenční mikroskopii

Fluorochromy:

- Auramin 0,1 g
- Rhodamin B 0,1 g
- H₂O dest. (pH 7,6) 1000 ml

Chemikálie i připravený roztok se musí uchovávat v tmavých lahvích, chráněných před světlem. Účinnost barviva musí být kontrolována průběžně na kontrolních preparátech. Pro výsledek barvení je velmi důležitá kvalita použitého Auraminu.

Odbarvovací roztok:

- NaCl 4 g
- HCl konc. 4 ml
- Alkohol 96% (lihobenzin) 1000 ml

Dobarvovací roztok: (Uchovávat v tmavé lahvi)

- Kyselý fuchsin 2 g
- HCl konc. 2 ml
- H₂O dest. 1000 ml

Jako dobarvovací roztok je možno také použít: Manganistan draselný (KMnO₄) 0,5 g

H₂O dest. 100 ml

Poznámka: Pro tyto účely lze použít chemikálie v čistotě „chemicky čistý“ nebo v čistotě p.a. „pro analysis“.

Příloha č. 3 – Složení základních roztoků kultivačních půd

Vaječná půda Löwenstein-Jensenova:

Základní roztok:

KH_2PO_4 2,40 g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,24 g
Mg citrát (nebo Na citrát) 0,60 g
L-asparagin 3,60 g
Glycerin 12,00 g
 H_2O dest. ad 600,00 ml

Vaječná půda podle Ogawy:

Základní roztok:

K_2PO_4 (bezvodý) 3,0 g
Na glutamát 3,0 g
 H_2O dest. 300,0 ml

Tekutá půda Šulova:

Základní roztok:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1,25 g
 KH_2PO_4 0,75 g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
Citronan sodný 1,25 g
L-alanin 0,075 g
Citronan železito-amonný 0,025 g
Kaseinový hydrolyzát 10% 25,00 ml
Glycerin redest. 15,00 ml
Malachitová zeleň oxalát 1,00 ml
(0,2% vodný roztok)
 H_2O dest. ad 1000,00 ml

Tekutá půda Baničova:

Základní roztok:

KH_2PO_4 2,5 g
 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g
 MgSO_4 1,0 g
Na citrát 2,5 g
L-asparagin 5,0 g
Citronan železito-amonný 0,05 g
Malachitová zeleň oxalát 0,1 ml
(2% vodný roztok)
 H_2O dest. ad 1000,0 ml