

**ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI**

**FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2019**

**Kristýna Šilhavá**



FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

**Kristýna Šilhavá**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**MYKOBAKTERIE A JEJICH ZDRAVOTNICKÝ VÝZNAM**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: MUDr. Jana Amlerová

PLZEŇ 2019





### Prohlášení

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

V Plzni dne 29. 3. 2019

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování:

Děkuji MUDr. Janě Amlerové za cenné rady a velmi ochotný přístup při vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Fakultní nemocnici v Plzni za poskytnutí materiálů pro tvorbu praktické části.

## **Anotace**

Příjmení a jméno: Šilhavá Kristýna

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Mykobakterie a jejich zdravotnický význam

Vedoucí práce: MUDr. Jana Amlerová

Počet stran – číslované: 35

Počet stran – nečíslované: 22

Počet titulů použité literatury: 20

Počet příloh: 7

Klíčová slova: mykobakterie, tuberkulóza, lepra, diagnostika

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá bakteriemi rodu *Mycobacterium*. Teoretická část je zaměřena především na obecnou charakteristiku rodu, metody používané k diagnóze mykobakterií a jejich klinický význam. Největší část práce je věnována právě klinickému významu a to hlavně nemocem tuberkulóza a lepra. V praktické části je vypracován přehled všech zachycených mykobakteriálních druhů za dané časové období v laboratoři Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a přehled metod, které byly k diagnostice použity. Dále je zde vyhodnocení zastoupení cizinců ve výskytu tuberkulózy ve sledovaném souboru.



## **Annotation**

Surname and name: Šilhavá Kristýna

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

Title of thesis: Mycobacteria and their medical importance

Consultant: MUDr. Jana Amlerová

Number of pages – numbered: 35

Number of pages – unnumbered: 22

Number of literature items used: 20

Number of appendices: 7

Keywords: mycobacterium, tuberculosis, leprosy, diagnostics

Summary:

This bachelor thesis deals with genus *Mycobacterium*. The theoretical part is focused on the general characteristics of the genus, the laboratory diagnosis of mycobacteria and its clinical importance. The significant part of the thesis is dedicated to clinical relevance, mainly tuberculosis and leprosy. In the practical application part there is an overview of all mycobacterial species, which were detected within a given period of time in the Department of Microbiology FN Pilsen, and a summary of used methods. Furthermore, there is an evaluation of the presence of foreigners in the occurrence of tuberculosis in the monitored set.

# OBSAH

ÚVOD .....	10
CÍL PRÁCE.....	11
HYPOTÉZY .....	12
TEORETICKÁ ČÁST .....	13
1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA MYKOBAKTERIÍ.....	14
1.1 Vlastnosti.....	14
1.1.1 Růst .....	14
1.1.2 Genom.....	15
1.1.3 Antigeny.....	15
1.2 Buněčná stěna .....	16
1.3 Klasifikace.....	16
1.3.1 Pomalu rostoucí mykobakterie .....	16
1.3.2 Rychle rostoucí mykobakterie.....	19
2 LABORATORNÍ PRŮKAZ MYKOBAKTERIÍ.....	21
2.1 Materiál .....	21
2.2 Zpracování vzorků .....	21
2.3 Průkaz mykobakterií .....	22
2.3.1 Přímá mikroskopie.....	22
2.3.2 Kultivační průkaz .....	22
2.3.3 Průkaz pokusem na morčeti .....	24
2.3.4 Molekulárně genetické metody .....	24
3 KLINICKÝ VÝZNAM.....	25
3.1 Tuberkulóza.....	25
3.1.1 Historie.....	25
3.1.2 Epidemiologie.....	25

3.1.3	Patogeneze.....	26
3.1.4	Klinický obraz .....	28
3.1.5	Terapie .....	28
3.1.6	Rezistentní kmeny Mycobacterium tuberculosis.....	28
3.1.7	Očkování .....	29
3.1.8	Tuberkulóza a AIDS .....	29
3.2	Lepra .....	30
3.2.1	Historie.....	30
3.2.2	Epidemiologie.....	30
3.2.3	Patogeneze.....	30
3.2.4	Klinický obraz .....	31
3.2.5	Terapie .....	31
3.3	Plicní infekce způsobené NTM .....	32
3.4	Kožní infekce způsobené NTM.....	32
PRAKTICKÁ ČÁST.....		33
4	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	34
5	METODIKA PRÁCE .....	35
6	VÝSLEDKY.....	37
7	DISKUZE.....	43
ZÁVĚR .....		44
LITERÁRNÍ ZDROJE A PRAMENY .....		45
SEZNAM ZKRATEK.....		47
SEZNAM TABULEK.....		48
SEZNAM GRAFŮ.....		49
SEZNAM PŘÍLOH.....		50
PŘÍLOHY.....		51

## ÚVOD

V této práci se zabývám rodem *Mycobacterium*, nejvýznamnějšími druhy tohoto rodu, diagnostikou a klinickým významem. Mezi klinicky nejvýznamnější druhy určité patří *M. tuberculosis*, *M. leprae* a *M. avium*, které způsobuje onemocnění plic podobné tuberkulóze.

Nejznámějším mykobakteriálním onemocněním je tuberkulóza. Je to infekční onemocnění, postihující hlavně plíce. Ročně zabijí asi 3 miliony lidí. Tuberkulóza je velký problém hlavně v rozvojových zemích. Ve vyspělých zemích představuje problém hlavně kvůli migraci obyvatelstva a nově vzniklým rezistentním kmenům, které špatně reagují na léčbu antituberkulotiky nebo nereagují na léčbu vůbec. Dalším důvodem, proč se tuberkulóza vyskytuje ve vysoké míře, je infekce HIV. Lidé, kteří jsou HIV pozitivní nebo je u nich již dokonce rozvinuté onemocnění AIDS, mají mnohem větší pravděpodobnost, že onemocní tuberkulózou.

Na to že v civilizovaných zemích se tuberkulóza vyskytuje méně, má bezesporu vliv vysoká úroveň sociálních podmínek. V minulých letech, kdy byl výskyt tuberkulózy ještě mnohem vyšší, mělo zásadní význam i očkování. U nás bylo očkování dříve povinné, dnes se očkují pouze děti, u kterých je reálné riziko, že se tímto onemocněním nakazí, například když někdo z rodiny má tuberkulózu.

Pokud je onemocnění diagnostikováno včas a nejedná se o rezistentní kmen, je velmi dobře léčitelné. K diagnostice je stále nejvíce používána kultivace vzorku. Někdy však může trvat i 9 týdnů, než mykobakterie vyrostou, z tohoto důvodu se k diagnostice tuberkulózy využívají i jiné metody jako mikroskopie nebo molekulárně genetické metody.

Mykobakterie způsobují ale i jiná onemocnění například lepru, která je problémem hlavně v rozvojových zemích, a také i jiné plicní i kožní nemoci.

## **CÍL PRÁCE**

Cílem této práce je vytvořit teoretický přehled klinicky významných mykobakteriálních druhů a nemocí které způsobují, dále přehled metod používaných k diagnostice mykobakterií. Praktická část je zaměřená na laboratorní metody používané v konkrétní mykobakteriologické laboratoři, na diagnostiku jednotlivých mykobakteriálních druhů a zastoupení cizinců ve výskytu tuberkulózy v daném souboru.

## **HYPOTÉZY**

1. Z pozitivních vzorků je ze zachycených mykobakteriálních druhů nejčastěji identifikováno *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Nejvíce vyšetřovaných vzorků pochází u diagnostiky mykobakteriálních onemocnění z dýchacích cest, konkrétně se nejčastěji vyšetřuje sputum.
3. Podíl cizinců je u pozitivních vzorků na *M. tuberculosis* vyšší než 20 %.

## **TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA MYKOBAKTERIÍ

Rod *Mycobacterium* patří do čeledi *Mycobacteriaceae* a řádu *Actinomycetales*. Mykobakterií je známo přes 150 druhů, mezi nimi jsou obligátně patogenní druhy, ale i podmíněně patogenní nebo nepatogenní druhy, které tvoří složku přírodních biotopů. Mezi obligátně patogenní druhy patří mykobakterie, které mají hodně společných znaků s *Mycobacterium tuberculosis*, patří do tzv. *Mycobacterium tuberculosis complex*. Mykobakterie můžeme rozdělit na skupinu pomalu rostoucích a rychle rostoucích druhů. Obligátně patogenní druhy patří mezi pomalu rostoucí.

Mykobakterie působí chronické infekce s velkým podílem přecitlivělosti a buněčné imunity. Většinou na ně působí jiné antimikrobiální látky než na ostatní bakterie (1, 2, 8, 10).

## 1.1 Vlastnosti

Mykobakterie jsou nepohyblivé a nesporulující tyčky, mohou mít různou délku a tvar od kokovitých až po vláknité formy. Jsou acidorezistentní, což znamená, že jsou obtížně barvitelné organickými barvivy a následně odolné k odbarvení kyselinami, zásadami a alkoholem. Toho využívá barvicí metoda podle Ziehl-Neelsena. Metodou podle Grama se barví velmi špatně. Acidorezistence je specifickým znakem mykobakterií a jen velmi zřídka ji pozorujeme u jiných bakterií. Způsobují ji lipidy v buněčné stěně, ty tvoří až 20 procent váhy sušiny. Z acidorezistence plyne odolnost mykobakterií proti vysychání a biocidům. Mykobakterie obsahují především mastné kyseliny a od nich odvozené estery, alkoholy a ketony. Průkaz těchto látek se používá k diagnostice mykobakterií. Typické pro mykobakterie jsou mykolové kyseliny, což jsou mastné kyseliny s 60–90 atomy uhlíku (1, 2, 3, 8).

### 1.1.1 Růst

Mykobakterie podle růstu můžeme rozdělit na rychle rostoucí a pomalu rostoucí. Mezi pomalu rostoucí patří mykobakterie ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis complex*. Pomalý růst mykobakterií je podmíněn dlouhou generační dobou. Ta je u *M. tuberculosis* kolem 20 hodin, ale u *M. leprae* se odhaduje až na 20 dní. Proto u *M. tuberculosis* vidíme růst kolonií nejdříve po 12 dnech, někdy až po 6 týdnech.



*M. leprae* se zatím nepodařilo in vitro kultivovat. Růst mykobakterií řadících se do skupiny rychle rostoucí můžeme pozorovat již po 7 dnech (1, 8).

### 1.1.2 Genom

Genom mykobakterií se vyznačuje vysokým obsahem guaninu a cytosinu. Někdy je v plastidech přítomna extrachromozomální DNA. Rozpoznání specifických částí DNA umožnilo vytvoření genetických sond, které slouží pro průkaz mykobakterií v materiálu k druhové identifikaci. Při amplifikaci fragmentů při polymerázové řetězové reakci (PCR) se jako primery používají oligonukleotidy o velikosti 30–200 bp, jejichž složení se určuje sekvenováním DNA. V DNA mykobakterií se vyskytují neustále se opakující charakteristické elementy o velikosti 5 kbp. Ty hybridizují s cílovými fragmenty DNA a využívají se jako genetické sondy. Tyto repetitivní elementy se využívají ke sledování přenosu kmenů v populaci a představují novou metodu molekulární epidemiologie (8).

### 1.1.3 Antigeny

Antigeny mykobakterií se odvozují od buněčné stěny, cytoplazmy a částečně se vylučují také extracelulárně. Kromě rozpustných proteinů a polysacharidů jsou v buněčné stěně nerozpustné antigeny, arabinogalaktan, peptidoglykan a komplexní glykolipidy. Nejznámějším antigenem je tuberkulin, který se používá ke kožnímu testování (Mantouxův test). U zdravých jedinců nevyvolá žádnou reakci, ale u infikovaných nebo u očkovaných osob dojde v místě vpichu do 48 hodin k zánětlivé reakci. Dnes se již ke kožnímu testu nepoužívá tzv. starý tuberkulin (*Tuberculinum vetus*), ale PPD (Purified protein derivative), který se získává chemickou frakcionací starého tuberkulinu. Dimykolát trehalózy, označovaný jako cord-faktor je toxický glykolipid, izolovaný z virulentních kmenů. U mykobakterií je to první popsáný faktor virulence. Inhibuje respiraci a fosforylaci tím, že mění strukturu membrány mitochondrií. Mykobakterie vyvolávají, jako většina intracelulárních parazitů, chronickou infekci. Její rozvoj závisí na množství zárodků a rychlosti nárůstu buněčné imunity (3, 8).

## 1.2 Buněčná stěna

Stavba buněčné stěny je poměrně složitá, ale odpovídá gram pozitivním mikrobům (viz Příloha č. 1). Je silná asi 20nm a tvoří ji peptidoglykanová vrstva, ve které jsou uloženy polysacharidové řetězce a mykolové kyseliny. Kolmo k povrchu buňky jsou v peptidoglykanové vrstvě uloženy řetězce kyselého polysacharidu kyseliny teichoové. Téměř všechny zbytky kyseliny N-acetylmuranové jsou spojeny peptidickými můstky. Hydrofobní zevní vrstva obsahuje lipidy a polypeptidy stimulující buněčnou imunitu (9).

## 1.3 Klasifikace

### 1.3.1 Pomalu rostoucí mykobakterie

#### 1.3.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* je původce tuberkulózy a je jedním z nejdůležitějších patogenů člověka. Je jím nakažena asi jedna třetina lidské populace ovšem příznaky tuberkulózy se projeví během života pouze u 10% nakažených. Ročně na toto onemocnění umírají 3 miliony lidí. *M. tuberculosis* objevil Robert Koch v roce 1892, proto se dodnes běžně používá triviální název bacil Kochův (BK). (9, 10, 18)

Jsou to velmi štíhlé, lehce zahnuté acidorezistentní tyčinky asi 0,5  $\mu\text{m}$  silné a 3  $\mu\text{m}$  dlouhé, někdy ve tvaru vláken. V preparátu z klinického materiálu je vidíme jednotlivě, někdy v podobě shluků, v preparátu z kultury jsou jako hadovité spletené útvary. *M. tuberculosis* je velmi odolné, v prachu vydrží až 10 dnů, ve vyschlém sputu až několik měsíců. Ani mnohá dezinfekční činidla nejsou účinná. Spolehlivě fungují především deriváty fenolu a aldehydy. Dobrým pomocným prostředkem je UV záření, k tomu jsou mykobakterie citlivé (1, 2, 9).

V naprosté většině případů se bakterie dostane do organismu dýchací soustavou, někdy trávicím traktem, velmi vzácně kůží. Bakterie jsou pohlceny plicními makrofágy, které zanášejí infekci do lymfatických uzlin. Ložisko v místě vstupu a lymfatická uzlina tvoří primární komplex, z něho se infekce může šířit dál do organismu. V neimunním organismu většina mykobakterií přežívá a množí se uvnitř makrofágu, některé ale přeci jen uhynou a jejich antigeny zahájí imunitní reakci buněčného typu. Poté už makrofágy začínají mykobakterie zabíjet a v ložisku infekce vzniká granulom. Malé granulomy jsou

propustné pro makrofágy, které bakterie v nich zlikvidují. Větší ložiska se ale opouzdří a makrofágy se do nich nedostanou. Léze se postupně hojí a kalcifikuje, mykobakterie uvnitř ale přežívají. Po letech se může tuberkulózní ložisko reaktivovat zejména ve stáří nebo jiným oslabením imunity (infekce HIV). Po reaktivaci tuberkulózního ložiska může vzniknout dutina (kaverna) a z té se kašlem mykobakterie šíří do okolí nemocného (otevřená tuberkulóza) (2, 9).

To zda se infekce *M. tuberculosis* projeví jako aktivní tuberkulóza, záleží na velikosti dávky bakterií, které byl jedinec vystaven, a na úrovni jeho odolnosti. Infekční dávka pro člověka je méně než 10 bacilů. Při práci s nimi je tedy velké riziko infekce. Během prvních dvou let po prodělání infekce onemocní 5% nakažených, dalších 5% onemocní později. U naprosté většiny případů tuberkulóza postihuje plíce, může ale postihnout kterýkoliv orgán (2, 9).

Generační doba *M. tuberculosis* je 18–24 hodin. Kultivace proto také trvá dlouho, na tuhé vaječné *Löwenstein-Jensenově* půdě roste 3–6 týdnů. Na této půdě roste v nažloutlých bradavčitých až květákovitých koloniích s nepravidelnými okraji a drolivou konzistencí. V tekutých půdách tvoří blanku a v Šulově půdě s glycerinem a sérem vytváří granulární sediment. Moderní poloautomatické systémy zaznamenají *M. tuberculosis* v tekutých půdách už většinou za 10–14 dní (9).

Laboratorní průkaz *M. tuberculosis* představují stále hlavně klasické postupy jako mikroskopie a kultivace. Také se používá průkaz specifických sekvencí nukleových kyselin. Klasickým vzorkem posílaným k průkazu *M. tuberculosis* je sputum. Veškerý klinický materiál se zpracovává v laboratoři v bezpečnostním boxu. Mikroskopické vyšetření je velmi cenné, i když po nálezů acidorezistentních tyček ve vzorku nemůžeme ještě jednoznačně říci, že jde o *M. tuberculosis*. Při kultivaci se musíme nejprve zbavit ostatních bakterií, které by *M. tuberculosis* rychle přerostly a vyšetření znehodnotily. Ostatní mikroflóry se zbavíme dekontaminačními postupy například mořením louhem sodným. Každý vzorek se očkuje na 3–4 různé typy půd, pevné i tekuté. Za 3 týdny již můžeme zachytit *M. tuberculosis*. Po 6 týdnech se vyšetření uzavírá a poslední odečítání po 9 týdnech se hlásí případně dodatečné nálezy (2, 9).

#### 1.3.1.2 *Mycobacterium leprae*

*Mycobacterium leprae* způsobuje onemocnění známé jako malomocenství neboli lepra. Původce objevil v roce 1873 norský lékař Gerhard Henrik Armauer Hansen. Proto je bakterie známá také jako Hansenův bacil (9, 20).

Je stejně jako ostatní mykobakterie obligátní intracelulární parazit. Doposud se ho nepodařilo vypěstovat *in vitro*. Množí se v amerických pásovcích, u kterých dojde k onemocnění po 2–3 letech po infekci. Další možností jsou imunosuprimované krysy nebo myši, kterým je *M. leprae* inokulováno do tlapky (2).

*M. leprae* vyvolává chronickou infekci. Onemocnění napadá kůži a podkožní nervy. Je to jediná bakterie, která napadá periferní nervy. Váže se na povrch Schwannových buněk a poškozují nervové vlákno (2, 9).

Onemocnění má několik forem od *lepry tuberkuloidní*, při které je v postižené části málo mykobakterií, až po těžkou *lepru lepromatózní*, kdy je nedostatečně vyvinutá buněčná imunita (8).

#### 1.3.1.3 *Mycobacterium bovis*

*Mycobacterium bovis* je patogenní pro skot, prasata a další druhy volně žijících zvířat. Genom *M. bovis* je téměř shodný s genomem *M. tuberculosis*. Jde o pomalu rostoucí mykobakterium, která tvoří drobné, lesklé, ploché, a bezbarvé kolonie. Špatně snáší přítomnost glycerinu a vyhovuje mu mikroaerofilní prostředí. Na *Löwenstein-Jensenově* půdě vyžaduje přídavek pyrohroznanu sodného. Nejlépe roste na *Ogawově* půdě s glutamátem. Dříve se přenášelo hlavně nepasterizovaným kravským mlékem a u člověka způsobovalo spíše tuberkulózu krčních uzlin a střev než plicní infekce (2, 5, 9).

#### 1.3.1.4 *Mycobacterium bovis* BCG

Zkratka BCG znamená *bacille Calmette-Guérin*. Vznikl mnohaletým pasážováním kmene *M. bovis*, izolovaného z tuberkulózní krávy, za nepříznivých podmínek. Tímto se natolik oslabil, že bylo možné ho použít jako očkovací látku. Používá se k očkování proti tuberkulóze (BCG vakcína). Ta ne vždy ochrání před infekcí, ale potlačí vznik závažných forem onemocnění. Geneticky je *M. bovis* BCG podobnější spíše *M. tuberculosis* než *M. bovis* (2, 9).

#### 1.3.1.5 *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium intracellulare*

*Mycobacterium avium* a *Mycobacterium intracellulare* patří do jednoho komplexu. Jejich patogenita je stejná a běžnými testy se nedají dobře rozlišit. Jsou patogenní pro ptáky včetně drůbeže a pro prasata. Také jsou rezistentní na většinu antituberkulotik. U člověka vyvolávají záněty krčních uzlin a plicní procesy podobné tuberkulóze. Vedle pneumocystózy a mykóz jde o nejčastější infekci doprovázející AIDS (2, 8, 9).

#### 1.3.1.6 *Mycobacterium kansasii*

*Mycobacterium kansasii* je u nás poměrně časté hlavně na Ostravsku. Je spojeno s důlním a hutním průmyslem. Vyvolává chronická plicní onemocnění připomínající tuberkulózu. Naštěstí je na většinu antituberkulotik citlivé.

Patří mezi tzv. fotochromogeny. Jeho kolonie na světle žloutnou (5, 9).

#### 1.3.1.7 *Mycobacterium xenopi*

*Mycobacterium xenopi* najdeme ve vodovodních systémech zvláště s teplou vodou. Může vyvolávat plicní infekce (2).

#### 1.3.1.8 *Mycobacterium ulcerans*

*Mycobacterium ulcerans* je pro nás exotické. Způsobuje burulský vřed, což je po tuberkulóze a lepre třetí nejčastější mykobakteriální onemocnění u osob s normální imunitou (2).

### 1.3.2 Rychle rostoucí mykobakterie

#### 1.3.2.1 *Mycobacterium chelonae*

Napadá imunosuprimované osoby a vyvolává různé infekce. Nejčastěji podkožní abscesy nebo osteomyelitidy po nesterilně podaných injekcích (2, 9).

#### 1.3.2.2 *Mycobacterium fortuitum*

Stejně jako *M. chelonae* způsobuje nejrůznější infekce, často kožní abscesy. Působí jen lokalizované infekce (2, 9).

### 1.3.2.3 *Mycobacterium abscessus*

Nalezneme ho ve vodovodní vodě. Infikuje plíce a rány, často pooperační (2).

## 2 LABORATORNÍ PRŮKAZ MYKOBAKTERIÍ

### 2.1 Materiál

Nejvhodnějším materiálem pro diagnostiku tuberkulózy (onemocnění způsobené druhy z komplexu *M. tuberculosis*) nebo plicní mykobakterií (onemocnění vyvolané netuberkulózními druhy mykobakterií) je sputum. Odesílá se 3 dny po sobě 2–5 ml sputa odebraného ráno na lačno. Pokud pacient nic nevykašlává, získává se sputum indukované po inhalaci teplého 15% roztoku NaCl.

Dalším možným materiálem je laryngeální výtěr. Ten se ale nepoužívá příliš často, protože z něj získáme jen malé množství materiálu. Používá se hlavně u pacientů, u kterých není možné získat sputum (děti a psychiatricky nemocní). Odesílají se 3 výtěry provedené na lačno hrtanovou sondou.

Výtěžnější než laryngeální výtěr je bronchoalveolární laváž a bronchiální výplach. Při plicní tuberkulóze můžeme vyšetřit i neutralizovanou žaludeční šťávu. Odběr žaludeční šťávy se provádí jen výjimečně. Provádí se na lačno sondou a odebírá se asi 30–100 ml.

Při jiných formách tuberkulózy nebo mykobakteriázách se posílá podle lokalizace infekce příslušný materiál jako hnis, likvor, biopsie, moč, stolice, krev apod.

Při odběru vzorku je nutné se vyhnout kontaminaci vodovodní vodou, která obsahuje jiné druhy mykobakterií (2, 11).

### 2.2 Zpracování vzorků

Každý vzorek, který přijde do laboratoře na vyšetření, musíme vnímat jako infekční. Mohl by obsahovat *M. tuberculosis*, a proto musí být dodrženy postupy bezpečnosti práce. Zpracovává se v bezpečnostním boxu. Nebezpečné je zejména otevírání nádobek se vzorky, třepání, příprava nátěrů, očkování. I při práci v bezpečnostním boxu je nutné mít ochranný oděv, ústenku a rukavice (2).

## 2.3 Průkaz mykobakterií

### 2.3.1 Přímá mikroskopie

Preparáty na průkaz mykobakterií barvíme podle Ziehl-Neelsena. Barví se karbofuchsinem za horka, poté se odbarvuje kyselým alkoholem a dobarvuje methylenovou modří nebo malachitovou zelení. Preparát se meandrovitě projíždí, pozoruje se při zvětšení 1000x a vyšetřuje se 50 zorných polí. Zorná pole musí být v pěti různých částech preparátu. Mykobakterie vidíme jako růžové tyčky na modrém nebo zeleném pozadí (viz Příloha č. 2).

Můžeme také použít fluorescenční barvení směsí auraminu O s rhodaminem. Tyčinky poté září ve fluorescenčním mikroskopu žlutozeleně na tmavorudém pozadí (viz Příloha č. 3). Toto barvení je výhodnější, protože se odečítá při menším zvětšení (200-400x).

U Ziehl-Neelsena i u fluorescenčního barvení hodnotíme výsledek semikvantitativně. Pokud v 50 zorných polí nenajdeme žádné nebo najdeme maximálně 4 tyčinky, je vzorek negativní. Pokud je nález 5–20 tyčinek hodnotíme nález jedním křížkem. Na dva křížky hodnotíme nález 21–100 tyčinek a více než 100 tyčinek pak na tři křížky.

Mikroskopie je při podezření na tuberkulózu výhodná oproti kultivaci hlavně pro svoji rychlost. Mikroskopie kultivaci nenahrazuje, ale pouze doplňuje. Oproti kultivaci je totiž mikroskopie mnohem méně citlivá. Pokud už má ale pacient sputum mikroskopicky pozitivní je pravděpodobně nebezpečným zdrojem mykobakterií (2, 11).

### 2.3.2 Kultivační průkaz

Tato metoda je oproti mikroskopickému vyšetření mnohem citlivější. Nevýhodou je ale délka kultivace trvající někdy i 9 týdnů.

Sterilní materiál jako likvor můžeme kultivovat rovnou. Většina vzorků (například sputum) ale obsahuje různé druhy dalších mikrobů, které by mykobakterie přerostly. Vzorky proto musíme těchto mikrobů zbavit. Vzorky dekontaminujeme takzvaným mořením vzorku. Moření provádíme například louhem sodným (hydroxid sodný). Během moření vzorku se mykobakterie také uvolňují z mucinu a vzorek se homogenizuje. Pomořený vzorek se poté zkoncentruje precipitací nebo centrifugací. Musíme ale počítat



s tím, že koncentrace činidla, teplota a doba moření má vliv i na samotné mykobakterie (2, 8).

Pro kultivaci mykobakterií se používají pevné půdy *Löwenstein-Jensenova* a *Ogawova*, a tekutá půda *Šulova*. Půda *Löwenstein-Jensenova* je vaječná půda, která obsahuje soli, asparagin, glycerin, škrob, vajíčka a malachitovou zeleň. Dává se do vysokých zkumavek a nechá se srazit v šikmé poloze. Je nazelenalá s lesklým povrchem. Pro průkaz *M. bovis* obsahuje místo glycerinu pyrohroznan sodný. *Ogawova* půda je také vaječná půda, ale místo asparaginu obsahuje glutamát. Tekutá *Šulova* půda obsahuje L-alanin a glycerin a je obohacena o kaseinový hydrolyzát a hovězí sérum (2, 11).

Půdy se inkubují při 37°C s výjimkou vzorků z kůže a abscesů, kde se očkují dvě řady a jedna se inkubuje při 30°C kvůli *M. marinum* a *M. chelonae*. Půdy odečítáme po 1, 3, 6 a 9 týdnech. Po 1 týdnu se někdy zachytí rychle rostoucí mykobakterie, hlavně ale toto odečítání slouží k vyrazení půd kontaminovaných. Za 3 týdny se již mohou zachytit další mykobakterie a začnou se určovat kmeny. Po 6 týdnech se vyšetření uzavírá a sdělují se výsledky, ale inkubace se prodlužuje na 9 týdnů. Po 9 týdnech se oznamují jen případné pozitivní nálezy a kultivace se ukončí. Vzorky, kde se předpokládá *M. ulcerans* podle mikroskopie, by se měli inkubovat ještě další 3 týdny (2, 11).

*M. tuberculosis* roste na pevných půdách jako nažloutlé, květákovité nebo bradavčité kolonie s nepravidelnými okraji (viz Příloha č. 4). V *Šulově* půdě roste *M. tuberculosis* jako hrudky nebo zrnka díky hydrofobnímu povrchu. *M. bovis* jsou drobné hladké nepigmentované kolonie. Ostatní mykobakterie tvoří různé, často lesklé nebo mazlavé kolonie. Rozdělujeme je na *nonchromogeny*, *skotochromogeny*, a *fotochromogeny*. *Nonchromogeny* nejsou nijak výrazně barevné, *skotochromogeny* tvoří i ve tmě výrazně žluté nebo oranžové kolonie a *fotochromogeny* se pigmentují, jen pokud rostou na světle (1, 2).

V mikrobiologických laboratořích se prosadily také rychlé kultivační postupy. Vyvinuly se poloautomatické přístroje, které dokážou zjistit pomnožení mykobakterií již za 14 dní například na základě snížení množství kyslíku v médiu nebo na základě uvolňování CO<sub>2</sub> (2, 11, 19).

### **2.3.3 Průkaz pokusem na morčeti**

Je nejcitlivější ale i nejnákladnější. K průkazu mykobakterií je vhodné morče, které je poměrně vnímavé. Pokus na morčeti se využíval dříve tam, kde se jednalo o vzácný materiál (likvor, hnis, bioptické vzorky, aj.) a materiál, o kterém se předpokládalo, že je paucibacilární nebo příliš kontaminovaný. Paucibacilární materiál obsahuje malé množství mikrobů. K vyvolání infekce u morčete stačí někdy i jen jedna bakterie.

Vzorek se očkuje zvířeti pod kůži na obou zadních končetinách na vnitřní straně stehen. Asi za 14 dnů se v místě vpichu může objevit vřed. U zvířat uhynulých za déle než 3 týdny nebo usmrčených za 6 týdnů hodnotíme orgány jak mikroskopicky tak makroskopicky.

Dnes je pokus na morčeti považován za zastaralý a je nahrazován modernějšími metodami (2, 11).

### **2.3.4 Molekulárně genetické metody**

V současné době se stále více k diagnostice mykobakterií používají molekulárně genetické metody. Základem molekulárně genetických metod je přímá diagnostika mykobakterií ve vzorcích. Před samotnou diagnostikou musíme amplifikovat sekvence nukleových kyselin specifických pro mykobakterie Amplifikací (zmnožením), která probíhá cyklickým reakčním procesem za pomoci enzymu polymerázy, se sekvence nukleových kyselin uvolňují z dvouřetězcové DNA a namnoží se do snadno detekovatelného množství. Tomuto produktu se říká amplikony. Ty jsou pak hybridizovány se značenými specifickými sondami a výsledek je detekován.

Tyto metody jsou senzitivní, specifické a velmi rychlé, výsledky máme už do několika hodin. Problémem však zůstává standardizace a spolehlivost výsledků PCR. Různé laboratoře totiž dosahují různých výsledků (2).

## 3 KLINICKÝ VÝZNAM

### 3.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza je celosvětově rozšířené onemocnění vyvolávané obligátně neboli primárně patogenními druhy mykobakterií z komplexu *Mycobacterium tuberculosis* nejčastěji *M. tuberculosis*. Tuberkulózu najdeme hlavně v chudých oblastech, kde je běžná podvýživa a špatné podmínky bydlení. Velmi vážné je onemocnění u lidí s AIDS. Každoročně tuberkulóza zabíjí asi 3 miliony lidí (7, 12).

#### 3.1.1 Historie

Tuberkulóza patří k onemocněním, které provázejí lidstvo odedávna. Dříve se jí říkalo součotiny. TBC můžeme prokázat na kosterních ostatcích z neolitu, starého Egypta i předkolumbovské Ameriky. V 17. a 18. století se v důsledku industrializace a rozrůstání měst se tuberkulóza rozšířila v Evropě. K rozšíření onemocnění došlo kvůli tomu, že se nahromadilo velké množství lidí ve městech, kde byly naprosto nevyhovující hygienické podmínky a mnoho lidí trpělo podvýživou. V této době umírala na tuberkulózu čtvrtina dospělé populace. Původce TBC objevil Robert Koch v roce 1882. Od objevu streptomycinu je možná cílená antituberkulózní léčba, ale i tak je tuberkulóza stále velkým celosvětovým problémem (12).

#### 3.1.2 Epidemiologie

Zdrojem nákazy je nemocný člověk, který vykašlává velké množství mykobakterií. Infekce vstupuje do organismu většinou plícemi. Rozlišujeme přenos suchou nebo vlhkou cestou. Vlhká cesta je přenos kapénkami při kašli a to až na 3 metry. U přenosu suchou cestou je inhalován infikovaný rozvířený prach. Díky lipidům v buněčné stěně, které brání vysychání, přežívají mykobakterie na vzduchu velmi dlouho. Minimální dávka, která je infekční pro člověka, je méně než 10 bacilů. Výjimečně je vstupní branou infekce trávicí trakt a to při vypití infikovaného mléka od nemocných krav. V tomto případě jde o nákazu *M. bovis*.

V současnosti je tuberkulózní infekcí promořena asi třetina populace a asi 30 miliónů lidí má aktivní formu TBC. Nejvíce jsou postiženy rozvojové země, ale infekce se vyskytuje i v civilizovaných zemích, to souvisí především s migrací. Vyšší riziko nákazy je u lidí drogově závislých a lidí bez domova (12).

### 3.1.3 Patogeneze

Tuberkulóza je infekční onemocnění s různými klinickými projevy. Nejčastěji postihuje plicе, může ale postihovat kterýkoliv orgán. Mikrob se do těla dostane vdechnutím, v plicích je pohlcen alveolárními makrofágy. Nahromaděním makrofágů vzniká drobný granulom, zvaný tuberkl. V něm se mykobakterie dále množí. Asi měsíc po infekci se začíná uplatňovat specifická imunitní odpověď organismu. Nově vytvořené makrofágy jsou již aktivované a mají baktericidní aktivitu, to brání dalšímu intracelulárnímu množení mikroba. V důsledku toho dochází ke kaseózní nekróze (zesýrovatění) tuberklu. Kaseózní ložisko se buď vyhojí, nebo zkapalní a může dojít k provalení do průdušek a šíření dýchacími cestami. V tomto případě se nemocný stává nebezpečným zdrojem infekce, protože mykobakterie vykašlává (4, 12).

Rozeznáváme několik forem tuberkulózní infekce. Prvním z nich je *primární tuberkulóza*. Ta vzniká v důsledku prvního kontaktu s tuberkulózní mykobakterií u osob, které nebyly očkovány. Mykobakterie se uchytí zpravidla v dolním plicním laloku. Část jich je fagocytována a transportována lymfatickými cestami do lymfatických uzlin. Tam vyvolávají zánětlivou reakci. U většiny nemocných proběhne bez jakýchkoliv klinických projevů. Primární TBC se většinou spontánně vyhojí (4, 6, 12).

*Postprimární tuberkulóza* se objevuje za několik týdnů někdy i za několik let od primární infekce. Postihuje zpravidla dospělé. Často se jedná o reaktivaci primární infekce, ale může jít i o exogenní superinfekci. To znamená, že došlo k přenosu infekce z nového zdroje na dříve již infikovaného jedince. Postprimární TBC má několik různých forem a nespecifický klinický obraz, často může vypadat jako jiné respirační onemocnění (7, 12).

Jednou z forem postprimární tuberkulózy je *infiltrativní tuberkulóza*, ta je charakteristická rentgenovým obrazem, na kterém vidíme zastínění, které způsobují infiltráty větší než 2cm (11).

Další je *ložisková tuberkulóza*, která se od infiltrativní liší velikostí ložisek. Ta u této formy nejsou větší než 2 cm (11).

*Rozpadová tuberkulóza* je charakteristická přítomností kaveren. Kaverny zasahují do bronchů, a proto je tato forma nebezpečná hlavně z epidemiologického hlediska. Nemocný totiž vykašlává velké množství mykobakterií a je rizikem pro své okolí (11).

*Tuberkulózní fibróza* je vlastně konečným stavem proběhlého tuberkulózního zánětu, který se zhojí jizvou. Do této formy mohou vyústit všechny formy TBC (11).

*Tuberkulózní zánět pohrudnice* vzniká přestupem zánětu na pleuru (11).

*Tuberkulóza hlasivek* je u nás velmi vzácná. Projevuje se chrapotem, bolestí při polykání a někdy i dušností, patří mezi pozdní komplikaci tuberkulózy (11).

*Tuberkulóza nitrohrudních mízních uzlin* je nejčastější v dětském věku. Může navazovat na primární tuberkulózu. Ložisko v plicích se sice vyhojí, ale proces v uzlinách pokračuje. Klinické projevy jsou vyvolány spíše zvětšením uzlin než tuberkulózním zánětem. K diagnostice slouží především rentgenový obraz (11).

*Miliární tuberkulóza* vzniká hematogenním rozsevem TBC infekce ze zánětlivého ložiska. Může vznikat jak z primární tak z postprimární tuberkulózy. Mykobakterie se dostanou do krevního řečiště a jsou roznášeny do organismu. Postiženy jsou hlavně dobře prokrvené tkáně jako plíce, slezina nebo ledviny. Na rentgenových snímcích plic vidíme drobná infekční ložiska, z tohoto nálezu vznik také název miliární (miliarium = zrnko prosa) (11, 12).

*Tuberkulóza jiných orgánů* než plic je méně častá. Většinou vzniká hematogenním rozsevem mykobakterií z ložiska v plicích. Mykobakterie vytváří malá infekční ložiska tuberkulidy. Často chybí klinické projevy a bakteriologická diagnostika je nesnadná. TBC může postihovat například nervovou soustavu. TBC nervové soustavy je závažnou komplikací a ohrožuje život nemocného. Může probíhat ve dvou základních formách. Častější z nich je tuberkulózní meningitida, která na rozdíl od klasické hnisané meningitidy začíná pozvolna, a podstatně méně častý tuberkulom. Dalším typem mimoplicní tuberkulózy je TBC kostí a kloubů. Mykobakterie se do kloubní štěrbině mohou dostat přímo z krevního řečiště. Synovium reaguje zánětem a tvorbou granulační tkáně, to způsobí erozi a postupné zničení chrupavky a někdy i přiléhající kosti. Mohou se také vyvinout tzv. studené abscesy – zánětlivá ložiska kolem kosti obsahující mimo jiné také zbytky kostní tkáně. TBC může postihovat také močové a pohlavní orgány, střeva, kůži

a podkožní vazivo, oko, ucho a prakticky jakýkoliv jiný orgán, do kterého se mykobakterie dostanou buď krví, nebo přestupem z okolních tkání (11, 12).

### **3.1.4 Klinický obraz**

Prvním příznakem plicní TBC je suchý dráždivý kašel, později se kašel mění na produktivní. Vykašlávané sputum velmi často obsahuje příměs krve. Dalším příznakem je zvýšená teplota. Ta se zvyšuje po fyzické nebo psychické námaze a zpravidla k večeru. Nemocný je unavený, malátný, více se potí a to zpravidla v noci, hubne a může cítit bolest na hrudníku.

Mezi komplikace tuberkulózy patří pneumotorax nebo pleurální výpotek. Další komplikací je masivní hemoptýza (vykašlávání krve z dolních cest dýchacích).

Při tuberkulóze nervové soustavy trpí nemocný první 3 týdny bolestí hlavy, je unavený, trpí nespavostí, nechutenstvím a ubývá na váze. Později zvrací a je přecitlivělý na zvuk a světlo. Následně dochází k poruchám vědomí a dalším příznakům jako obrna okohybného nervu (12).

### **3.1.5 Terapie**

Léčba TBC patří plně do rukou specialistů. Léčí se dlouhodobým a nepřerušovaným podáváním kombinace antituberkulotik. Mezi tyto AT patří isoniazid (INH), pyrazinamid (PZA), rifampicin (RMP), etambutol (EMB) a streptomycin (STM). Existují ještě další, ale ty jsou buď toxičtější, nebo méně účinné či nákladnější. Obvykle se k léčbě používá čtyřkombinace INH-RMP-PZA-EMB po dobu 2 měsíců. Následně léčba pokračuje dvojkombinací INH-RMP po dobu 4 měsíců. Kombinovaná léčba je pojistkou proti vzniku rezistence na AT (7, 12).

### **3.1.6 Rezistentní kmeny *Mycobacterium tuberculosis***

Rezistence na AT je velmi závažná, dochází k ní nedodržením léčebných postupů. V ČR se situace bedlivě sleduje a není nijak dramatická. K rezistenci dochází hlavně v zemích, kde je tuberkulózy nejvíce. Mezi ty patří rozvojové země Jižní Ameriky, Asie a také země bývalého Sovětského svazu.

Rezistentní kmeny rozdělujeme na monorezistentní, polyrezistentní, MDR a XDR. Jako monorezistentní označujeme kmen odolný vůči jednomu ze základních AT. Polyrezistentní jsou kmeny odolné vůči dvěma a více AT s výjimkou současné rezistence k INH a RIF a termín MDR (multiple drug resistance) označuje kmeny rezistentní minimálně k INH a RIF současně. Ty léčíme pomocí AT druhé řady, které jsou toxičtější a také dražší. Nově byly objeveny kmeny tuberkulózy rezistentní téměř ke všem AT druhé řady. Tyto extrémně lékově odolné kmeny jsou označovány jako XDR (extensively drug resistant) a jsou charakteristické rezistencí minimálně k INH a RIF a současně k fluorochinolonům a všem injektabilním antibiotikům (12, 15, 16).

### 3.1.7 Očkování

Očkování proti TBC se nazývá kalmetizace a provádí se vakcínou BCG, která se aplikuje pod kůži. Vakcína BCG (*bacille Calmette-Guérin*) je připravená z *M. bovis*. Očkování zavedli A. Calmette a C. Guérin v roce 1921 po více než desetiletém výzkumu.

Donedávna bylo v ČR očkování novorozenců proti TBC povinné. Povinné bylo také přeočkování na základě negativního výsledku tuberkulinového testu. V roce 2010 byla plošná vakcinace u nás zrušena a nahrazena vakcinací selektivní. Dnes se tedy očkují jen ohrožení novorozenci, jejichž rodiče, sourozenci nebo člen domácnosti měli nebo mají aktivní TBC, popřípadě žijí nebo pocházejí ze země s vysokým výskytem TBC. Riziko se zjišťuje v porodnici na základě dotazníku (7, 12, 13, 14).

### 3.1.8 Tuberkulóza a AIDS

Onemocnění AIDS je ve vyspělých zemích důvodem, proč výskyt tuberkulózy v současnosti neklesá. Je zde také souvislost s migrační vlnou obyvatelstva. HIV pozitivní mají asi 80x vyšší pravděpodobnost onemocnění tuberkulózou než zdraví lidé. U nemocných s AIDS je pravděpodobnost onemocnění až 170x vyšší. Právě tuberkulóza je nejzávažnější oportunní infekcí u AIDS. Prokazatelně urychluje přechod infekce HIV v AIDS a zhorčuje průběh samotné nemoci.

Stanovení diagnózy může být obtížné. Klinický obraz je nenápadný, ze začátku se objevují pouze teploty. Rentgenový obraz je často negativní stejně jako mikroskopické vyšetření. Mykobakterie se prokáží až kultivačně.

Léčba tuberkulózy u nemocných AIDS je stejná jako u zdravých lidí. Výsledky léčby jsou dobré, ale efekt nastupuje pomaleji. Problémem při léčbě bývá i špatná snášenlivost léků. Díky tomu se často setkáváme s polyrezistentními nemocnými a tuberkulóza způsobená polyrezistentním kmenem bývá většinou smrtelná (11).

## **3.2 Lepra**

Název nemoc dostala z řeckého slova lepis (šupina). Jde o onemocnění kůže, jehož původcem je *M. leprae*. Lepra je známá také pod názvem malomocenství. V současnosti představuje problém hlavně v Jihovýchodní Asii, Africe i Americe (4, 12).

### **3.2.1 Historie**

První zmínky o onemocnění připomínající lepru můžeme najít už v Egyptských záznamech z roku 2 400 př. n. l. Do Evropy se Lepra dostávala postupně válečnými taženími. Již ve středověku si lidé uvědomovali infekčnost nemoci a izolovali nemocné v leprosáriích. Lepra společně s morem, jsou dvě infekční nemoci, které nejvíce poznamenali středověkou Evropu. Později ve 14. století začal výskyt lepry klesat, pravděpodobně proto že většinu nemocných leprou zemřela na mor. Další teorií je, že lepru vytlačil bacil tuberkulózy (4, 12).

### **3.2.2 Epidemiologie**

Zdrojem nákazy je nemocný člověk. Lepra není vysoce nakažlivá, k přenosu onemocnění je nutný dlouhodobý kontakt. Přenáší se většinou kapénkově a nosním sekretem, ale k přenosu může dojít i mateřským mlékem nebo kontaktem s postiženou kůží. V postižené kůži je však jen málo bakterií. Vyskytuje se především v zemích, kde jsou špatné sociální a hygienické podmínky. Inkubační doba onemocnění je 3–20 let, u dětí může být jen několik měsíců (4, 12).

### **3.2.3 Patogeneze**

*M. leprae* se k nervům dostane buď přímo kůží, nebo z krve. Mikrob se váže na povrch Schwannových buněk, proniká do nich a kolonizuje je. Způsobuje demyelinizaci a poškození nervového vlákna. Když se rozvine buněčná imunita, vytvoří se v poškozeném nervu granulomatózní zánět a poškození se jen prohlubuje. Infekci šíří napadené makrofágy, ve kterých se mykobakterie může množit.



Onemocnění nenapadá jen nervy, může způsobovat také infekci kůže, sliznice horních cest dýchacích, a pojivové tkáně (12).

### 3.2.4 Klinický obraz

Lepra se dělí na dvě formy, tuberkuloidní a lepromatózní. Časně stádium lepry, u kterého není poznat, jestli se jedná o tuberkuloidní nebo lepromatózní formu, se označuje jako indeterminovaná lepra. Jejím prvním projevem je neostře ohraničená makula (skvrna), která je buď světlejší, nebo naopak začervenalá. V jejím okolí je snížená citlivost. Tato forma lepry se buď vyhojí, nebo přechází do lepromatózní nebo tuberkuloidní formy.

Tuberkuloidní lepra je většinou neinfekční, pozvolna probíhající a často dochází ke spontánnímu ústupu nemoci. Buněčná imunita nemocného infekci zvládá. Kožní ložiska jsou chudá na mykobakterie. Typický je pro tuto formu vznik několika rozsáhlých, ostře ohraničených makul, které jsou hyperpigmentované a kůže na nich šupinatí. Postižená místa jsou nejprve přecitlivělá a poté necitlivá, také na nich dochází ke ztrátě ochlupení. Obecně je u této formy postižení nervů závažnější. Z tuberkuloidní formy se může rozvinout forma lepromatózní.

Pro lepromatózní formu lepry je typické postižení kůže především na obličeji, rukou a nohou. V postižených oblastech kůže je velké množství bacilů. Vlivem nemoci mohou vypadávat řasy a obočí, někdy i vlasy. Dochází k deformaci částí obličeje, zvětšení nozder a tváří a obličej nabývá charakteristického „lvího“ vzhledu (*facies leontina* - viz Příloha č. 5). Postižena bývá také sliznice nosu a dochází ke zničení nosní přepážky. Současně dochází k postižení periferních nervů, které zduří, a můžeme je nahmatat pod kůží, někdy mohou být i viditelné (4, 6, 12).

### 3.2.5 Terapie

Pokud je nemoc diagnostikována v časném stádiu a léčba se zahájí okamžitě, prognóza bývá poměrně dobrá. K léčbě se využívá kombinace léků, aby nedocházelo k rezistenci. Lepromatózní forma je léčena trojkombinací dapson-rifampin-clofazimin. Tato trojkombinace se podává minimálně 2 roky, ale léčba může být i celoživotní. Při tuberkuloidní formě podáváme kombinaci dapson-rifampin minimálně 6 měsíců (4).

### 3.3 Plicní infekce způsobené NTM

Netuberkulózní mykobakterie (NTM) se vyskytují prakticky všude v okolním prostředí. Nacházíme je v půdě, vodě, vodovodním potrubí i jinde. Infekcí jsou ohroženi hlavně jedinci se sníženou imunitou například osoby s AIDS. Nejčastějšími druhy, které způsobují netuberkulózní plicní infekce u nás, jsou *M. kansasii*, *M. xenopi* a *M. avium*.

Klinické příznaky jsou podobné jako u tuberkulózy. Typický je kašel a hnisavé sputum. Někdy může být únava, zvýšena teplota nebo hemoptýza (11, 12).

### 3.4 Kožní infekce způsobené NTM

Kožní infekce mohou způsobovat *M. marinum* a *M. ulcerans*. Jsou to druhy pomalu rostoucích mykobakterií, které preferují nižší teplotu, a proto způsobují právě kožní léze.

*M. marinum* je původce tzv. „bazénového granulomu“ nebo také „akvariijního granulomu“. K infekci dochází přes drobná poranění, která vzniknou například při koupání v moři, bazénu nebo také čištění akvária. Toto poranění pak kontaminují bakterie z okolí a za 2–8 týdnů se objeví počáteční léze.

*M. ulcerans* způsobuje onemocnění zvané „burulský vřed“ (viz Příloha č. 6). Vředy jsou obvykle bezbolestné. Toto onemocnění se vyskytuje především v Africe a Austrálii, jinde ho najdeme jen vzácně (4).

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

## **4 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU**

V praktické části byly zkoumány vzorky, které byly vyšetřeny v Laboratoři pro diagnostiku mykobakterií Ústavu mikrobiologie Fakultní nemocnice v Plzni. Všechny zkoumané vzorky byly vyšetřeny od 1. 1. 2018 do 31. 12. 2018. Laboratoř vyšetřuje vzorky pro Plzeňský kraj a některé zdravotnická zařízení z jiných krajů. Celkem bylo vyšetřeno 7596 vzorků.

## 5 METODIKA PRÁCE

Všechny vzorky přijaté do laboratoře byly překontrolovány s žádankou o vyšetření. Každému vzorku se přidělilo protokolové číslo a vzorek byl zadán do laboratorního systému.

Nejprve probíhala příprava vzorků. Nejčastějším materiálem, který se zpracovával, bylo sputum. K extrémně hnisavému a vazkému sputu se přidalo ekvivalentní množství rozpouštěcího roztoku (fyziologický roztok s Tween 80) a vzorek se protřepal. Pokud byl objem větší než 10ml, vzorek se centrifugoval 10 minut při 3500 ot/min. K moči se přidaly 3 kapky kyseliny sulfosalicylové a vzorek se centrifugoval. Tekuté materiály do 5 ml nevyžadují žádnou přípravu. Tekuté materiály nad 5 ml byly centrifugovány. U každého materiálu se vždy dále zpracovávalo 5 ml.

Dále byly vzorky dekontaminovány. K dekontaminaci byla použita metoda s N-acetyl-L-cysteinem. Do každého vzorku se přidal roztok N-acetyl-L-cysteinu s NaOH, 5% Tween 80 a fosfátový pufr. Vzorek se vždy průběžně protřepával a následně centrifugoval 30 minut při 3500 ot/min. Po centrifugaci se slil supernatant a přidal se fyziologický roztok s Tween 80. Následovala resuspendace vortexem nebo propláchnutí Pasteurovou pipetou.

Všechny vzorky byly očkované na kultivační vaječné půdy, Löwenstein-Jensenovu a Ogawovu, a do zkumavek pro metabolickou kultivaci v přístroji Bactec MGIT. Na vaječné půdy se očkovalo 0,2–0,5 ml a po naočkování se vzorkem pokryl celý povrch půdy. Naočkované půdy se uložily v šikmém stojanu na 24–72 hodin do termostatu na 37 °C. Následně se půdy uložily do boxu podle probíhajícího kalendářního týdne opět do termostatu o teplotě 37 °C. Výsledek se odečítal klasicky po 3, 6 a 9 týdnech. Do zkumavek pro Bactec MGIT bylo očkováno 0,5 ml vzorku a zkumavka se vložila do přístroje BACTEC MGIT 960. Pozitivita vzorku se hlásila indikujícímu lékaři, kultivace negativních vzorků byla ukončena v Bactec MGIT po 42 dnech, na vaječných půdách po 9 týdnech.

Mikroskopický preparát byl zhotoven ze všech vzorků, kromě moči a LV. Podložní sklíčko se očistilo isopropylalkoholem a nakapaly se na něj 1–2 kapky vzorku. Poté se nechalo zaschnout v laminárním boxu při pokojové teplotě. Zaschlé preparáty se fixovaly

ve sterilizátoru 15 minut při 100°C a před samotným barvením se každý preparát 3x protáhl plamenem. Vzorky se barvili buď fluorescenčním barvením nebo metodou dle Ziehl-Neelsena. Pro barvení dle ZN se sklíčka vyskládala na mřížku a polila karbolfuchsinem, který se nechal působit 5 minut. Během této doby se sklíčka zahřívala nad plamenem. Poté se barvivo slilo a sklíčko se opláchno. Následovalo přelití odbarvovacím roztokem, který se po 2–3 minutách opláchl. Poslední krok bylo dobarvování malachitovou zelení a po opláchnutí se preparáty uložily do stojánku a nechaly uschnout. Druhým typem barvení je fluorescenční. Fixované preparáty vyskládané na mřížce se přelily roztokem pro fluorescenční barvení A, který se nechal působit 10 až 15 minut a poté se opláchl vodou. Následovalo odbarvení fluorescenčním roztokem B a po opláchnutí dobarvení fluorescenčním roztokem C. Preparáty se nechaly uschnout a do odečítání byly uloženy ve tmě.

Na PCR vyšetření se odebralo 0,3–0,5 ml dekontaminovaného vzorku do eppendorfky označené protokolovým číslem a ještě tentýž den se alikvota vzorku přepravila na úsek bakteriologie a mykologie.

Zbytky vzorků byly uloženy v chladničce do druhého dne a likvidovány až po uzavření výsledků mikroskopie.

## 6 VÝSLEDKY

Za období od 1. 1. 2018 do 31. 12. 2018 bylo v laboratoři vyšetřeno 7596 vzorků z různých zdravotnických zařízení. Do laboratoře chodily na vyšetření různé druhy materiálu. V následující tabulce č. 1 je uveden přehled druhů materiálu a počty vyšetřených vzorků v mykobakteriologické laboratoři podle typu indikujícího zdravotnického zařízení.

**Tabulka č. 1 Druhy materiálu a počty vyšetřených vzorků v mykobakteriologické laboratoři podle typu indikujícího zdravotnického zařízení.**

Odesílatel	Materiál									Celkem
	sputum	jiný respirační materiál	LV	moč	hnis	punktát	likvor	uzlina	jiný	
Poliklinika ne TRN	92	3	0	41	3	11	0	1	39	<b>190</b>
Lůžka ne TBC	387	113	27	23	14	145	1	3	57	<b>770</b>
Léčebna TRN	1946	0	67	13	0	0	0	0	18	<b>2044</b>
Lůžka TRN	1271	216	68	18	0	156	0	0	24	<b>1753</b>
Poliklinika TRN	2061	602	16	36	0	101	0	0	10	<b>2826</b>
Oddělení patologie	0	0	0	0	0	0	0	0	13	<b>13</b>
<b>Celkem</b>	<b>5757</b>	<b>934</b>	<b>178</b>	<b>131</b>	<b>17</b>	<b>413</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>161</b>	<b>7596</b>

Zdroj: Ústav mikrobiologie FN v Plzni

Ze všech vyšetřených vzorků bylo pozitivních 610 vzorků u 171 pacientů. U některých pacientů byla pozitivita zachycena opakovaně, proto je počet pozitivních vzorků vyšší. V následující tabulce č. 2 lze vidět počet pozitivních pacientů podle druhu zachyceného agens. V tabulce nejsou uvedeny 4 vzorky od 4 pacientů, u kterých mykobakterie byly zachyceny jen mikroskopicky a nebyly identifikovány. Tyto vzorky dále neuvádím.

Z celkového počtu pozitivních vzorků 606 bylo 569 vzorků pozitivních kultivačně, 33 vzorků pozitivních jen mikroskopicky a 4 vzorky pozitivní jen metodou průkazu DNA. To je vidět v tabulce č. 3, kde jsou výsledky rozděleny podle jednotlivých vyšetřovacích metod.

To, že jsou některé vzorky pozitivní jen mikroskopicky, je způsobeno tím, že pacient již může být léčen, takže mykobakterie jsou již mrtvé. Tyto bakterie již kultivačně nevyrostou, ale stále je můžeme pozorovat v mikroskopu.

**Tabulka č. 2 Počet pacientů s pozitivním výsledkem podle jednotlivých druhů mykobakterií**

<b>Druh</b>	<b>Počet pozitivních pacientů</b>
<i>M. tuberculosis</i>	74
<i>M. avium</i>	35
<i>M. intracellulare</i>	7
<i>M. kansasii</i>	4
<i>M. abscessus</i>	4
<i>M. xenopi</i>	6
<i>M. szulgai</i>	2
<i>M. malmoense</i>	1
<i>M. fortuitum</i>	15
<i>M. porcinum</i>	1
<i>M. senegalense</i>	1
<i>M. kumamotoense</i>	1
<i>M. gordonae/paragordonae</i>	16
<b>Celkem</b>	<b>167</b>

Zdroj: Ústav mikrobiologie FN v Plzni



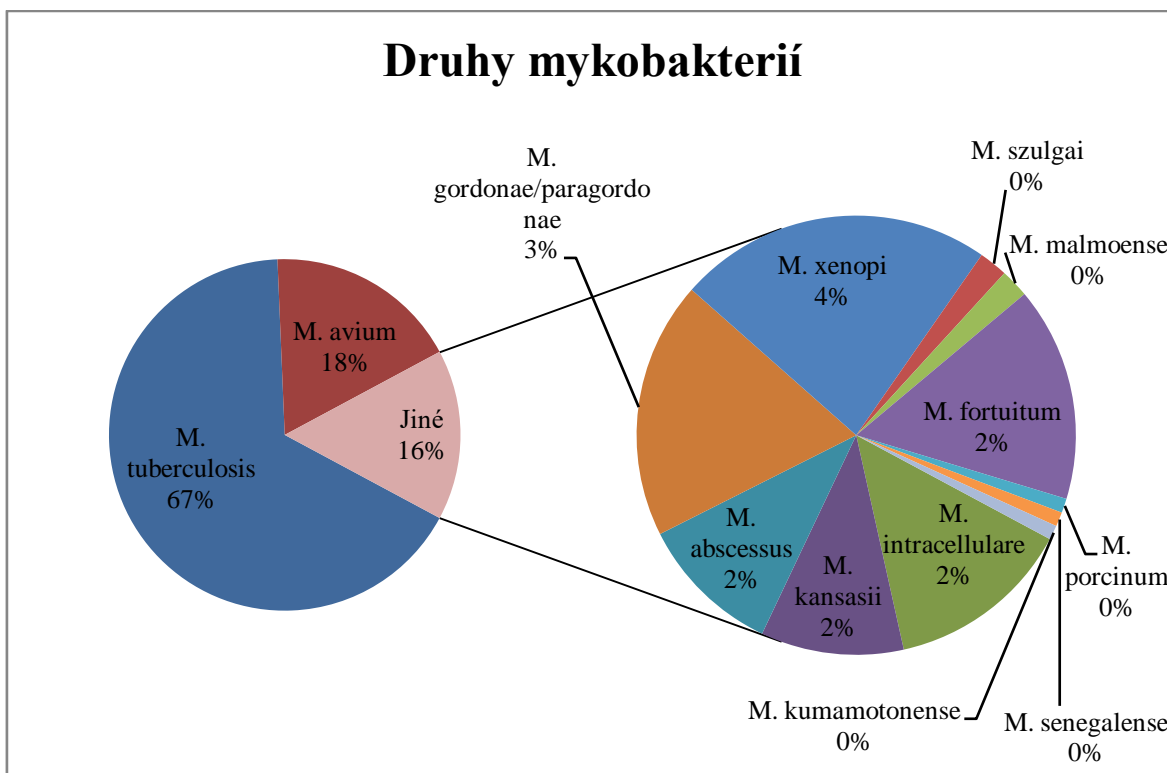
**Tabulka č. 3 Počet pozitivních vzorků podle jednotlivých mykobakteriálních druhů**

<b>Druh</b>	<b>Počet pozitivních vzorků</b>	<b>Kultivačně pozitivní</b>	<b>Jen mikroskopicky pozitivní</b>	<b>Jen DNA pozitivní</b>
<i>M. tuberculosis</i>	403	370	29	4
<i>M. avium</i>	108	107	1	0
<i>M. intracellulare</i>	13	12	1	0
<i>M. kansasii</i>	10	10	0	0
<i>M. abscessus</i>	10	10	0	0
<i>M. xenopi</i>	22	20	2	0
<i>M. szulgai</i>	2	2	0	0
<i>M. malmoense</i>	2	2	0	0
<i>M. fortuitum</i>	15	15	0	0
<i>M. Porcium</i>	1	1	0	0
<i>M. senegalense</i>	1	1	0	0
<i>M. kumamotoense</i>	1	1	0	0
<i>M. gordonae/paragordonae</i>	18	18	0	0
<b>Celkem</b>	<b>606</b>	<b>569</b>	<b>33</b>	<b>4</b>

Zdroj: Ústav mikrobiologie FN v Plzni

Z tabulky č. 3 jsem pro lepší přehlednost vytvořila graf č. 1, kde vidět je procentuální zastoupení jednotlivých druhů mykobakterií v celkovém počtu pozitivních vzorků 606. Z grafu vidíme, že *M. tuberculosis* tvoří 67% pozitivních vzorků.

**Graf č. 1 Procentuální zastoupení mykobakteriálních druhů v celkovém počtu pozitivních vzorků**



Zdroj: Ústav mikrobiologie FN v Plzni

V následujícím grafu č. 2 vidíme procento pozitivních vzorků z celkového počtu vzorků 7596 zkoumaných v laboratoři.

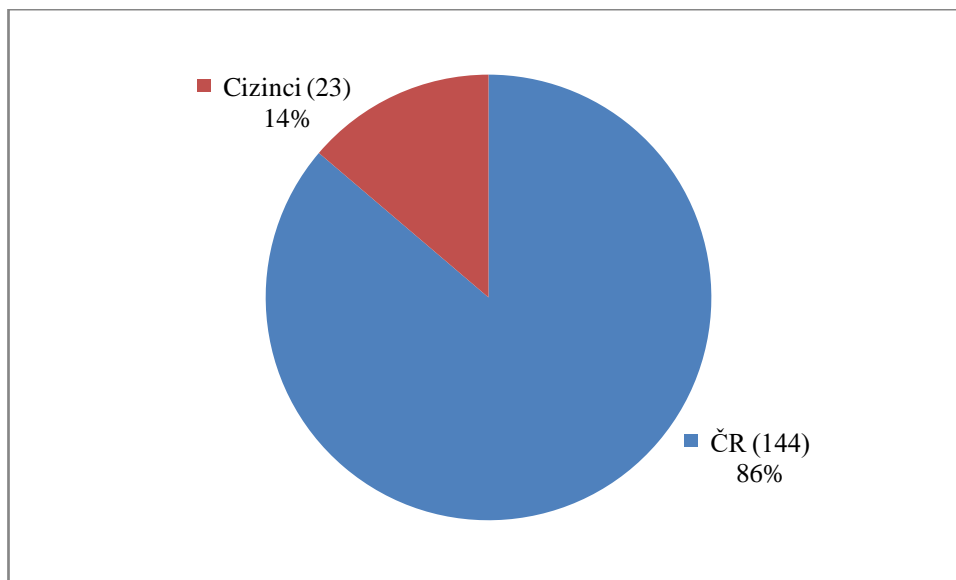
V teoretické části jsem zmínila vliv migrace obyvatelstva na výskyt tuberkulózy u nás, v grafu č. 3 tedy můžeme vidět, kolik procent z celkového počtu 167 pozitivních pacientů tvoří cizinci. Nejčastěji byli cizinci pozitivní na *M. tuberculosis* a to v 21 případech z celkových 23. Zbylí dva byli pozitivní na jiný mykobakteriální druh. Cizinci tvořili tedy 28% ze všech pacientů pozitivních na *M. tuberculosis* – viz graf č. 4.

**Graf č. 2 Procento pozitivních vzorků z celkového počtu vzorků**



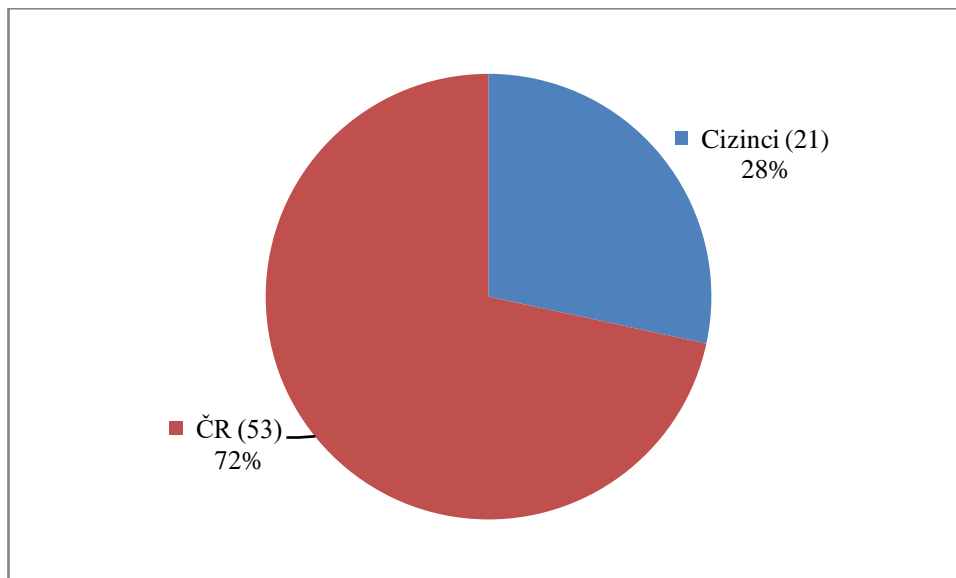
Zdroj: Ústav mikrobiologie FN v Plzni

**Graf č. 3 Procentuální zastoupení cizinců v celkovém počtu pozitivních pacientů**



Zdroj: Ústav mikrobiologie FN v Plzni

**Graf č. 4** Procentuální zastoupení cizinců ve skupině pacientů pozitivních na *M. tuberculosis*



Zdroj: Ústav mikrobiologie FN v Plzni

## 7 DISKUZE

Celkem bylo vyšetřeno 7596 vzorků z různých pracovišť. Laboratoř přijímá vzorky k diagnostice mykobakterií prakticky z celého Plzeňského kraje. Z tohoto celkového počtu bylo pozitivních 606 vzorků u 167 pacientů. To znamená, že 7,98 % vzorků bylo pozitivních. Byla potvrzena druhá hypotéza, protože nejčastějším vyšetřovaným materiálem bylo sputum nebo jiný respirační materiál, což odpovídá tomu, že mykobakteriální onemocnění nejčastěji postihuje plíce. Výjimečně se vyšetřuje i materiál jako hnis nebo likvor.

Naprostá většina vzorků byla pozitivních kultivačně, ale některé vzorky byly pozitivní pouze mikroskopicky nebo jen DNA. To, že byly vzorky pozitivní jen mikroskopicky, je způsobeno tím, že pacient může být již léčen a mykobakterie ve vzorku jsou mrtvé. Takové mykobakterie již kultivačně nevyrostou, ale můžeme je stále pozorovat mikroskopicky.

Nejčastěji bylo diagnostikováno *M. tuberculosis*, čímž se potvrdila první hypotéza. Pozitivních bylo 403 vzorků u 74 pacientů. Druhým často diagnostikovaným bylo *M. avium*. Tady vyšlo pozitivně 108 vzorků celkem u 35 pacientů. Počet pozitivních vzorků, je vyšší oproti počtu pozitivních pacientů z důvodu, že se pacient vyšetřuje opakovaně kvůli monitorování léčby.

*M. tuberculosis* bylo zachyceno u 74 pacientů, což je vzhledem k počtu lidí, žijících v Plzeňském kraji nad celostátním průměrem, který je 4,8 na 100 000 obyvatel (17). Obecně je výskyt tuberkulózy u nás velmi nízký a z dlouhodobého hlediska má klesající charakter. Ze 74 pacientů pozitivních na *M. tuberculosis* bylo 21 cizinců tedy 28,4%. To zhruba odpovídá celorepublikové situaci. Podle výsledků ÚZIS tvořili cizinci v roce 2017 více než 31,5 % pozitivních pacientů (17). Tím byla potvrzena i třetí hypotéza, že počet cizinců bude vyšší než 20%.

## ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem shrnula poznatky o rodu *Mycobacterium*. V první kapitole jsem se věnovala obecné charakteristice a vlastnostem mykobakterií, je zde také vypracován přehled klinicky významných druhů. V druhé kapitole najdeme přehled možností diagnostiky mykobakterií. V rámci této kapitoly jsou zde vypsány druhy biologického materiálu využívané k diagnostice a diagnostické metody. K diagnostice mykobakterií se nejčastěji využívají metody kultivace a mikroskopie. Třetí a poslední kapitola teoretické části je věnována klinickému významu mykobakterií, především onemocněním jako tuberkulóza a lepra. Klinicky nejvýznamnějším a nejčastěji diagnostikovaným mykobakteriálním onemocněním je právě tuberkulóza.

Byly potvrzeny všechny hypotézy. Nejčastěji diagnostikovaným mykobakteriálním druhem bylo *M. tuberculosis*. Materiálem, nejčastěji posílaným k diagnostice bylo sputum a jiný respirační materiál. A podíl cizinců z celkového počtu pozitivních pacientů byl větší než 20%.

Naplněn byl rovněž cíl praktické části práce, kde najdeme vyhodnocení všech laboratorních výsledků z roku 2018. Je zde zpracován přehled všech zachycených mykobakteriálních druhů za dané časové období a přehled metod, které byli k diagnostice použity. Dále je zde vyhodnocení vlivu migrace na výskyt tuberkulózy ve sledovaném souboru.

Česká republika patří mezi země s nízkým výskytem tuberkulózy, ale i tak bychom jí měli věnovat pozornost, především kvůli migraci obyvatelstva a výskytu nových rezistentních kmenů. Zlepšovat by se měla především diagnostika tuberkulózy, která by díky molekulárně genetickým metodám mohla být rychlejší a díky tomu by se mohla dříve začít její léčba.

## LITERÁRNÍ ZDROJE A PRAMENY

1. **SCHINDLER**, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.
2. **VOTAVA**, Miroslav a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
3. **BROOKS**, George F. et al. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 26/E. New York: McGraw Hill Medical, 2012. ISBN 978-0-07-181578-9.
4. **GOERING**, Richard V, Hazel M DOCKRELL, Mark A ZUCKERMAN a Peter L CHIODINI, JULÁK, Jaroslav, ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Přeložil Jan BOBEK, přeložila Renáta ČERMÁKOVÁ, přeložil Karel HOLADA, přeložila Zora MĚLKOVÁ, přeložil Tibor MOŠKO, přeložil Jan NOVÁK, přeložila Ludmila PROKEŠOVÁ, přeložila Jiřina SUCHANOVÁ. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016. ISBN 9788073879280.
5. **NĚMEC**, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 9788021079236.
6. **BARER**, Michael R. and Will L. IRVING. *Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control*. Amsterdam: Elsevier Health Sciences, 2018. ISBN: 9780702071980.
7. **VOTAVA**, Miroslav. *Klinická mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7503-0.
8. **BEDNÁŘ**, Marek et al. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN: 9788023802979.
9. **VOTAVA**, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 9788090289666.
10. **Biological Library**. *Mycobacterium - Druhy*[online]. Biolib.cz [cit. 11. 01. 2019]. Dostupné z:<https://www.biolib.cz/cz/taxonsubtaxa/id477011/?subtaxcat=150>
11. **POKORNÝ**, Antonín, František SALAJKA a Zdeněk MERTA. *Tuberkulóza*. Brno: Masarykova univerzita, 1998. ISBN 8021018518.
12. **BENEŠ**, Jiří. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-644-1.

13. **VZP ČR.** *Jak je to s očkováním proti tuberkulóze? Když bylo zrušeno z povinných dětských očkování, znamená to, že se proti ní vůbec neočkuje, nebo to jen nehradí pojišťovna? Čekám miminko a zrovna tuberkulóza je nemoc, proti které bych ho raději očkovat nechala.* [online]. VZP ČR [cit. 10. 01. 2019]. Dostupné z: <https://www.vzp.cz/o-nas/tiskove-centrum/otazky-tydne/jak-je-to-s-ockovanim-proti-tuberkuloze>
14. **VOTAVA, Miroslav.** *Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přeprac. vyd.* Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
15. **PLESNÍK, Vladimír.** *Nebezpečí tuberkulózy vyvolávané extrémně rezistentními kmeny Mycobacterium tuberculosis.* [online]. 2006 [cit. 17. 01. 2019]. Dostupné z: [http://www.khsova.cz/docs/01\\_odborna\\_cinnost/files/sms028.pdf](http://www.khsova.cz/docs/01_odborna_cinnost/files/sms028.pdf)
16. **BÁRTŮ, Václava.** *Tuberkulóza a její rezistentní formy* [online]. Interní medicína pro praxi, 2007 [cit. 20. 01. 2019]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/int/2007/09/02.pdf>
17. **ÚZIS, Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2017.** [online]. 2017 [cit. 06. 02.2019]. Dostupné z: [file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/tbc2017\\_cz.pdf](file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/tbc2017_cz.pdf)
18. **KŘEPELA, Karel.** *Tuberkulóza dětí a dorostu a její diferenciální diagnostika.* Praha: Maxdorf-Jessenius, 1995. ISBN 8085912031.
19. **KOZÁKOVÁ, B.** *Posouzení účinnosti metabolické kultivační rychlometody MGIT (manuální systém) pro záchyt mykobakterií ve srovnání s klasickou kultivační metodou* [online]. 2006 [cit. 12. 02 2019]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie/2006-1/posouzeni-ucinnosti-metabolicke-kultivacni-rychlometody-mgit-manualni-system-pro-zachyt-mykobakterii-ve-srovnani-s-klasickou-kultivacni-metodou-3764#>
20. **SEHGAL, Alfica.** *Leprosy.* Philadelphia: Chelsea House Publishers, 2006. ISBN 9870791085028.



## SEZNAM ZKRATEK

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

AT – antituberkulotikum

BBL MGIT – označení zkumavek s kultivačním médiem pro Bactec MGIT 960

BCG – bacille Calmette Guérin

BK – bacil Kochův

bp – base pairs (párů bází)

EMB – etambutol

HIV – Human Immunodeficiency Virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)

INH – isoniazid

Kbp – kilo base pairs (tisíc párů bází)

MDR – multiple drug resistance

NTM – netuberkulózní mykobakterie

PCR – polymerázová řetězová reakce

PPD – purified protein derivative

PZA – pyrazinamid

RMP – rifampicin

STM – streptomycin

TBC – tuberkulóza

UV – ultrafialový

ÚZIS – Ústav zdravotnických informací a statistiky

XRD – extensively drug resistant

ZN – Ziehl-Neelsen

## SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Druhy materiálu a počty vyšetřených vzorků v mykobakteriologické laboratoři podle typu indikujícího zdravotnického zařízení.....	37
Tabulka č. 2 Počet pacientů s pozitivním výsledkem podle jednotlivých druhů mykobakterií.....	38
Tabulka č. 3 Počet pozitivních vzorků podle jednotlivých mykobakteriálních druhů .....	39

## SEZNAM GRAFŮ

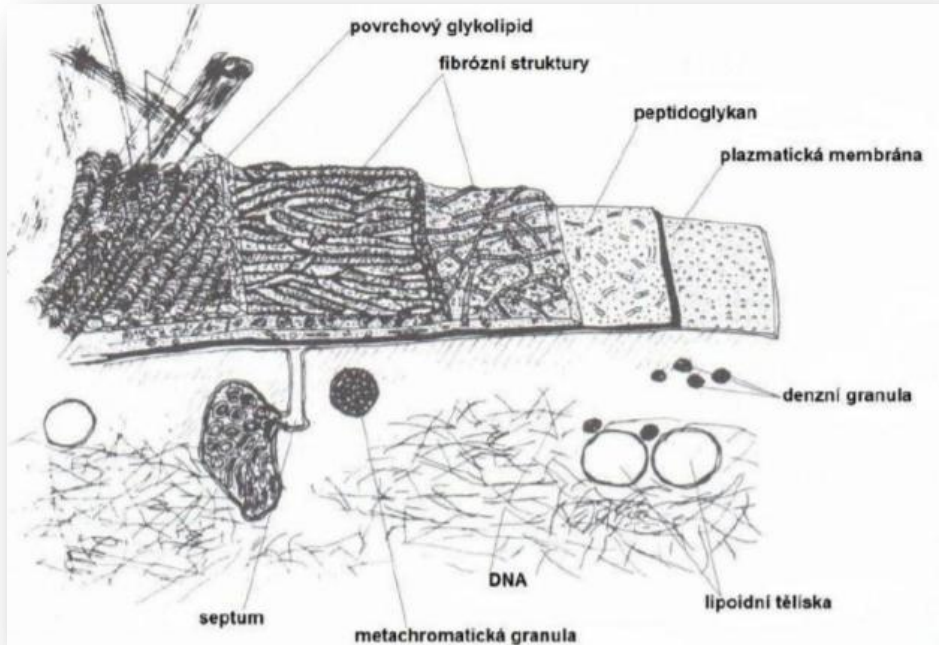
Graf č. 1 Procentuální zastoupení mykobakteriálních druhů v celkovém počtu pozitivních vzorků.....	40
Graf č. 2 Procento pozitivních vzorků z celkového počtu vzorků.....	41
Graf č. 3 Procentuální zastoupení cizinců v celkovém počtu pozitivních pacientů .....	41
Graf č. 4 Procentuální zastoupení cizinců ve skupině pacientů pozitivních na <i>M. tuberculosis</i> .....	42

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Schéma buněčné stěny mykobakterií.....	51
Příloha 2: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - barvení podle Ziehl-Neelsena.....	52
Příloha 3: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - fluorescenční barvení.....	53
Příloha 4: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - kolonie.....	54
Příloha 5: Postižení obličeje při lepromatózní lepre .....	55
Příloha 6: Burulský vřed na kotníku .....	56
Příloha 7: Povolení sběru informací ve FN Plzeň .....	57

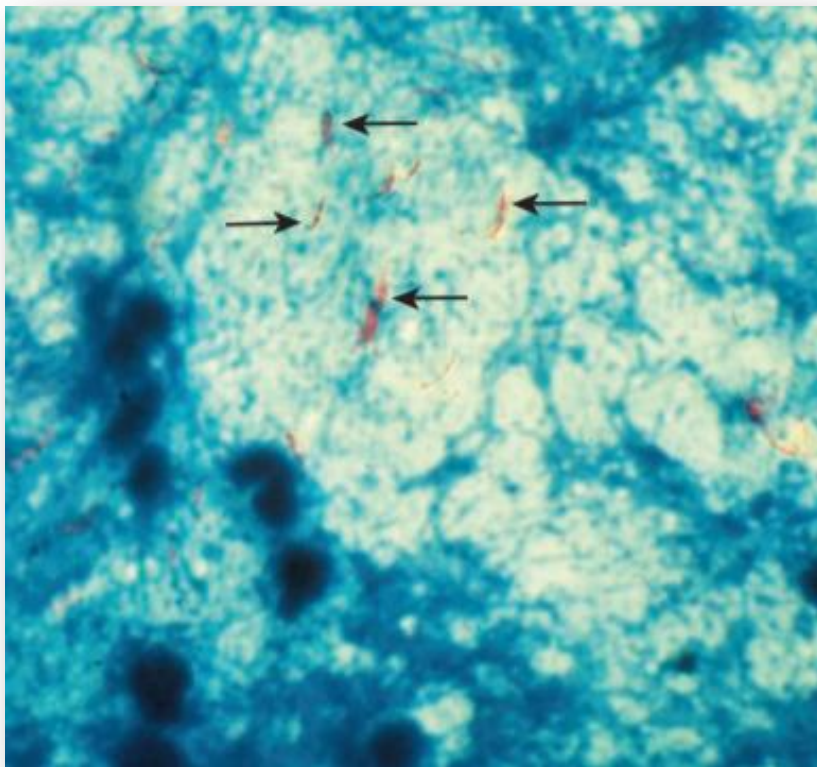
# PŘÍLOHY

Příloha 1: Schéma buněčné stěny mykobakterií



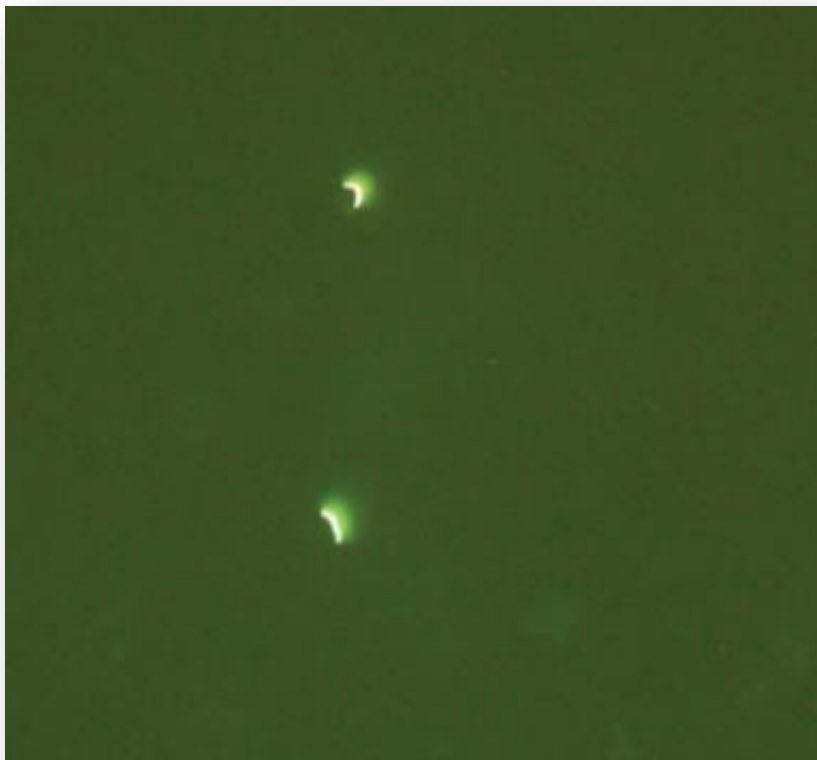
Zdroj obrázku: BEDNÁŘ, Marek et al. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. s. 306

**Příloha 2: *Mycobacterium tuberculosis* - barvení podle Ziehl-Neelsena**



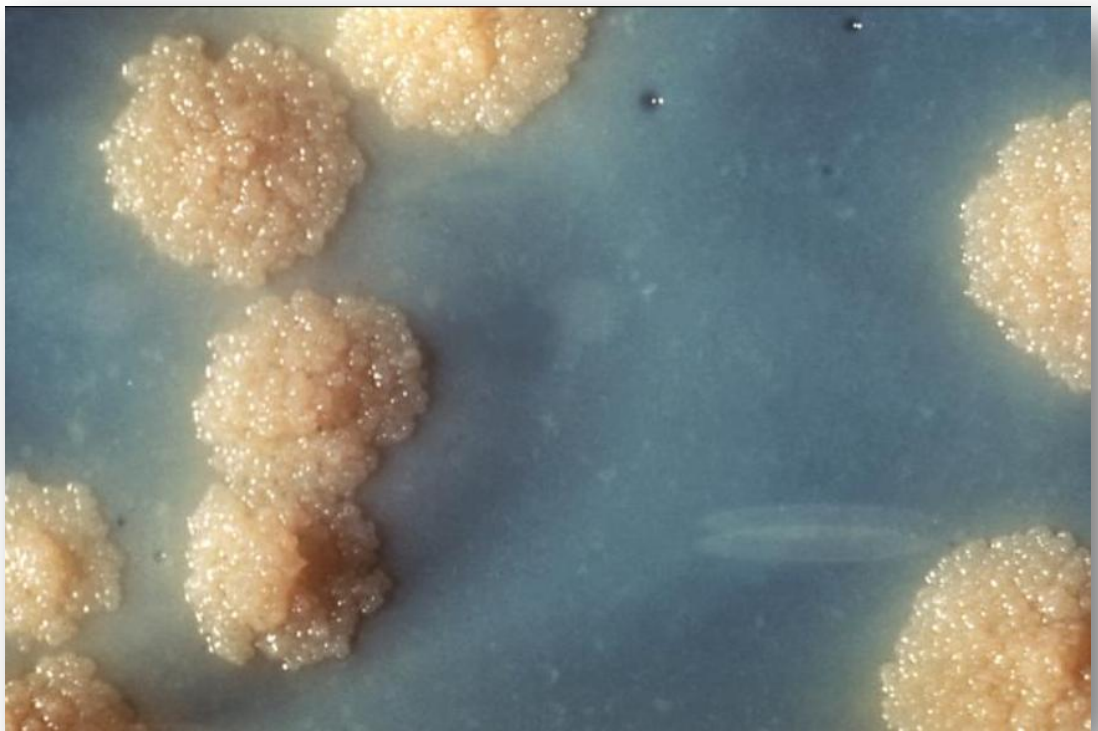
Zdroj obrázku: BROOKS, George F. et al. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 26/E. New York: McGraw Hill Medical, 2012. s. 315

**Příloha 3: *Mycobacterium tuberculosis* - fluorescenční barvení**



Zdroj obrázku: BROOKS, George F. et al. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 26/E. New York: McGraw Hill Medical, 2012. s. 315

**Příloha 4: *Mycobacterium tuberculosis* - kolonie**



Zdroj

obrázku:[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0a/TB\\_Culture.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0a/TB_Culture.jpg)



## Příloha 5: Postižení obličeje při lepromatózní leprě



Zdroj obrázku: GOERING, Richard V, Hazel M DOCKRELL, Mark A ZUCKERMAN a Peter L CHIODINI, JULÁK, Jaroslav, ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Přeložil Jan BOBEK, přeložila Renáta ČERMÁKOVÁ, přeložil Karel HOLADA, přeložila Zora MĚLKOVÁ, přeložil Tibor MOŠKO, přeložil Jan NOVÁK, přeložila Ludmila PROKEŠOVÁ, přeložila Jiřina SUCHANOVÁ. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016. s. 356

## Příloha 6: Burulský vřed na kotníku



Zdroj obrázku:

[https://www.wikiskripta.eu/w/Atypick%C3%A1\\_mykobakteria#/media/File:Buruli\\_ulcer\\_left\\_ankle\\_EID.jpg](https://www.wikiskripta.eu/w/Atypick%C3%A1_mykobakteria#/media/File:Buruli_ulcer_left_ankle_EID.jpg)

## Příloha 7: Povolení sběru informací ve FN Plzeň



**FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ**  
Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči  
Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory  
stej Svatobody 88, 304 60 Plzeň - Lochotín  
ICO 00689806 tel.: 377 401 111, 377 183 111

Vážená paní

Kristýna Šilhavá

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií - Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví  
Západočeská univerzita v Plzni

### Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem informací o laboratorních metodách a výsledcích těchto metod, používaných v Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracování Vaší bakalářské práce s názvem „*Mykobakterie a jejich zdravotnický význam*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně provedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.**, o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a **pod přímým vedením** oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je paní **Amlerová Jana, MUDr., lékařka MIKRO FN Plzeň**.

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová  
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP  
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň  
tel.: 377 103 204, 377 402 207  
e-mail: [chabrovas@fnplzen.cz](mailto:chabrovas@fnplzen.cz)

5. 3. 2019