

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Laboratorní vyšetření klinických vzorků na přítomnost bakterií rodu  
*Mycobacterium*  
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Petra Kvardová**  
Osobní číslo: **C17364**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Laboratorní vyšetření klinických vzorků na přítomnost bakterií rodu *Mycobacterium***  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Zpracujte literární rešerši na dané téma bakalářské práce. V rešerši se zaměřte na:

1. *Mycobacterium* sp., popište mykobakteria způsobující tuberkulózu.
2. Postup detekce, kultivace a diagnostiky mykobakterií, včetně odběru materiálu, příjem materiálu, pravidla práce s bakterií rodu *Mycobacterium*.
3. Možnost terapie a prevence onemocnění.
4. Z dostupné literatury zjistěte výskyt onemocnění v České republice.

Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019: Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

**20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 17. 7. 2020

Petra Kvardová

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat za trpělivost a dobré rady při psaní této bakalářské práce mé vedoucí Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. rovněž za to, že mi umožnila zpracovat téma, které mě zajímalo. Za inspiraci a pomoc bych také chtěla poděkovat MUDr. Janě Svobodové. V neposlední řadě pak za velkou podporu své rodině, kamarádům a Kateřině Hábové.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zaměřuje na základní morfologii rodu *Mycobacterium*, jejich rozdělení a patogenitu. Popisuje klinicky významné mykobakterie. Dále práce obsahuje druhy materiálu, jeho zpracování a metody diagnostiky. Rovněž stručně popisuje terapii, prevenci a výskyt TBC v ČR v roce 2017 a 2018.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mykobakterie, tuberkulóza, diagnostika, kultivace, mikroskopie

## **TITLE**

Detection of the genus *Mycobacterium* in Clinical Samples

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis focuses on the basic morphology of the genus *Mycobacterium*, their distribution and pathogenicity. It describes clinically important mycobacteria. Furthermore, this thesis contains types of materials, its processing and diagnostic methods. It also briefly describes the therapy, prevention and incidence of tuberculosis in the Czech Republic in 2017 and 2018.

## **KEYWORDS**

Mycobacteria, tuberculosis, diagnostics, cultivation, microscopy

## Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	10
ÚVOD.....	12
1 ETIOLOGIE.....	13
1.1 HISTORIE TBC.....	13
1.2 TAXONOMIE.....	13
2 CHARAKTERISTIKA RODU <i>MYCOBACTERIUM</i> .....	14
2.1 OBECNÁ MORFOLOGIE.....	14
2.1.1 BUNĚČNÁ STĚNA.....	14
2.1.2 RYCHLOST RŮSTU.....	15
2.1.3 PRODUKCE PIGMENTŮ.....	15
2.2 PATOGENEZE A PATOGENITA.....	17
3 KLINICKY VÝZNAMNÉ DRUHY.....	18
3.1 <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....	18
3.1.1 CORD FAKTOR.....	18
3.2 <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> KOMPLEX.....	19
3.3 <i>MYCOBACTERIUM MARINUM</i> .....	19
3.4 <i>MYCOBACTERIUM XENOPI</i> .....	20
3.5 <i>MYCOBACTERIUM FORTUITTUM</i> .....	21
3.6 <i>MYCOBACTERIUM ABSCESSUS</i> KOMPLEX.....	21
3.7 <i>MYCOBACTERIUM KANSASII</i> .....	22
4 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA.....	23
4.1 DRUHY MATERIÁLU.....	23
4.1.1 ODBĚR MATERIÁLU.....	23
4.1.2 PŘÍJEM A ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU.....	24
4.2 PRAVIDLA PRÁCE S BAKTERIÍ RODU <i>MYCOBACTERIUM</i> .....	25
4.3 DEKONTAMINACE A HOMOGENIZACE VZORKU.....	25

4.3.1	PETROFFOVA MODIFIKOVANÁ METODA .....	26
4.3.2	ZPRACOVÁNÍ PRO PCR .....	26
4.4	KULTIVACE .....	26
4.4.1	TEKUTÉ PŮDY .....	26
4.4.2	PEVNÉ PŮDY .....	27
4.5	TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI .....	28
4.5.1	PROPORČNÍ METODA DLE CANETTIHO .....	28
4.6	MIKROSKOPIE .....	28
4.6.1	FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE .....	28
4.6.2	SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE .....	29
4.6.3	HODNOCENÍ PREPARÁTU .....	30
4.7	MOLEKULÁRNÍ METODY .....	31
4.7.1	RYCHLÝ MOLEKULÁRNÍ TEST GeneXpert .....	32
4.7.2	MALDI-TOF-MS.....	32
4.8	IGRA TESTY .....	33
5	MOŽNOSTI TERAPIE A PREVENCE ONEMOCNĚNÍ.....	34
5.1	TERAPIE .....	34
5.1.1	PROCES LÉČBY .....	34
5.1.2	MECHANISMUS ÚČINKU .....	36
5.1.3	REZISTENCE .....	36
5.1.4	RECIDIVITA .....	37
5.2	PREVENCE .....	37
5.2.1	OČKOVÁNÍ.....	37
6	VÝSKYT ONEMOCNĚNÍ V ČESKÉ REPUBLICE.....	39
7	ZÁVĚR.....	44
8	LITERÁRNÍ ZDROJE .....	45
9	ZDROJE OBRÁZKŮ A TABULEK .....	53



## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , původce TBC (Janice Carr, 2006) .....	14
Obrázek 2 Mykobakteriální buněčná stěna (Van Ingen, 2014) .....	15
Obrázek 3 <i>M. tuberculosis</i> na Löwenstein-Jensenově půdě (George Kubica, 2011) .....	18
Obrázek 4 <i>M. avium</i> na Middlebrookově agaru, dvě nejčastější morfologie kolonií (běžové neprůhledné a menší průsvitné) (Van Ingen <i>et al.</i> , 2017) .....	19
Obrázek 5 Fotochromogenní <i>Mycobacterium marinum</i> (Aubry Alexandra, 2017) .....	20
Obrázek 6 <i>M. fortuitum</i> , nechromogenní, rychle rostoucí na Middlebrookově agaru (Van Ingen <i>et al.</i> , 2017) .....	21
Obrázek 7 <i>Mycobacterium kansasii</i> na LJ půdě (Reading Nathan, 2010) .....	22
Obrázek 8 Nátěr acidorezistentních bakterií obarvený fluorescenčním barvením auramin-rhodamin (Caulfield <i>et al.</i> , 2016) .....	29
Obrázek 9 Čistá kultura <i>M. tuberculosis</i> barvení dle Ziehl-Neelsova (Gaiao, 2015) .....	30

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Charakter růstu, pigmentace a patogeneze mykobakterií (Votava <i>et al.</i> , 2003) .....	16
Tabulka 2 Antituberkulotika používaná k léčbě TBC (Bailo <i>et al.</i> , 2015) .....	35
Tabulka 3 Hlášené počty TBC v krajích ČR za rok 2017 (ÚZIS, 2018) .....	39
Tabulka 4 Hlášené počty TBC v krajích ČR za rok 2018 (ÚZIS, 2019) .....	40
Tabulka 5 Hlášená onemocnění TBC u cizinců podle země narození (ÚZIS, 2018 a 2019) ...	41
Tabulka 6 Hlášené počty mykobakterióz jiných než TBC (ÚZIS, 2018 a 2019) .....	42
Tabulka 7 Hlášené počty zemřelých na TBC z registru TBC v krajích ČR (ÚZIS, 2018 a 2019) .....	43

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIDS – syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immunodeficiency Syndrome)

Anti-TB – antituberkulotika

ART – acido rezistentní tyčky

BCG – Bacillus-Calmette Guérin vakcína

CFP-10 – proteiny kultivačního filtrátu (Culture Filtrate Protein)

CFU – kolonie tvořící jednotka (Colony Forming Units)

CNS – centrální nervový systém

DHB – kyselina 2,5-dihydroxybenzoová

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ELISA – enzymem značený imunosorbentová analýza (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

EMB – antituberkulotikum etambutol

ESAT-6 – časný sekreční antigenní cíl (Early Secretory Antigenic Target)

HIV – virus lidské imunodeficiency (Human Immunodeficiency Virus)

IFN-  $\gamma$  – interferon gamma

IGRA – test uvolňování interferonu gama (Interferon Gamma Release Assay)

INH – antituberkulotikum izoniazid

LAM – lipoarabinomannan

LJ – Löwenstein-Jensenova půda

LTBI – latentní tuberkulózní infekce

MAI-C – *Mycobacterium avium-intracellulare* komplex

MALDI-TOF MS – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem.

MDR – multi rezistentní kmeny

MGIT – Zkumavka pro indikaci množství namnožených mykobakterií (Mycobacteria Growth Indicator Tube)

MTBC – *Mycobacterium tuberculosis* komplex

NTM – netuberkulózní mykobakterie

ORL – Otorinolaryngologie

PCR – polymerázová řetězová reakce

PIM – fosfatidylinositol manosid

PZA – antituberkulotikum pyrazinamid  
RIF – antituberkulotikum rifampicin  
STM – antituberkulotikum streptomycin  
SVD – sterilní destilovaná voda  
TBC – tuberkulóza  
TDR – totálně rezistentní kmeny  
WHO – Světová zdravotnická organizace  
XDR – extenzivně rezistentní kmeny

## ÚVOD

K výběru zaměření a tématu bakalářské práce mě inspirovala odborná praxe v mikrobiologické laboratoři. Její součástí bylo oddělení diagnostiky mykobakterií. Prohlídka laboratoře a seznámení s celým průběhem laboratorního vyšetření mě nadchlo natolik, že jsem se touto problematikou chtěla zabývat.

Jak napovídá samotný název, v práci se zaměřuji na laboratorní vyšetření. Součástí je i popis celého rodu *Mycobacterium*. Přibližuji nejčastěji zachycené mykobakterie v laboratoři, jaké onemocnění mohou vyvolávat a jak se od sebe liší. Čtenář mé práce se může seznámit s celým procesem laboratorní diagnostiky od odběru vzorku, jeho zpracování až po finální hodnocení.

V práci se věnuji i možnostem terapie tuberkulózy a zabývám se problematikou rezistence mykobakterií k antituberkulotikům.

Jako cíl práce jsem si stanovila shromáždit co nejvíce informací o dané problematice a jasně a srozumitelně vše zpracovat. Informace jsem čerpala z odborných článků, knih i rozhovorů s kompetentní osobou v laboratoři zabývající se diagnostikou těchto bakterií.

# 1 ETIOLOGIE

## 1.1 HISTORIE TBC

V 19. století byla tuberkulóza známa pod jménem součotě. Jedná o onemocnění přenášené formou aerosolu, obvykle postihující plíce. Projevuje se těžkým kašlem, horečkou a bolestí hrudníku.

Tato choroba byla lépe pochopena v roce 1882, když německý mikrobiolog Robert Koch oznámil, že původcem tuberkulózy je bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulin byl objeven v roce 1890 a vakcína BCG roku 1908. Léky proti tuberkulóze se začaly používat v roce 1943, poskytly naději na vymýcení nemoci. Míra úmrtnosti se od začátku do poloviny 20. století výrazně snížila. Z finančních důvodů se zpomalil vývoj antituberkulotik a vakcín. V souvislosti s pandemickým nárůstem onemocnění AIDS se zvýšil i výskyt tuberkulózy (TBC). Díky tomu vzrostl zájem o výzkum a prevenci (Fogel, 2015).

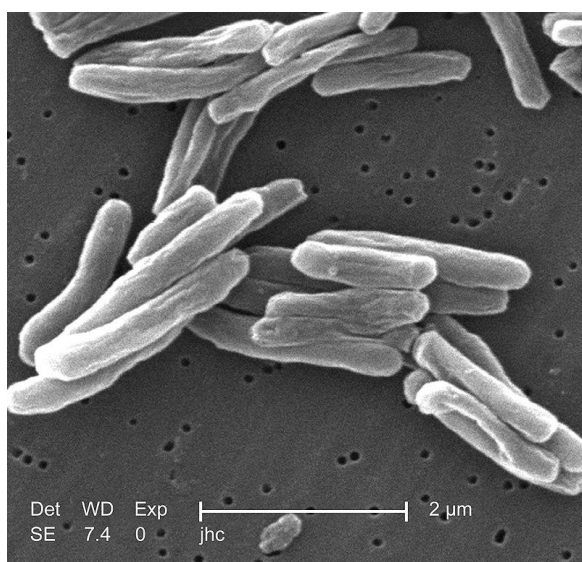
## 1.2 TAXONOMIE

Do rodu *Mycobacterium* patří více než 190 druhů bakterií, řadí se do čeledi *Mycobacteriaceae*, řád *Corynebacteriales*, třída *Actinobacteria* a doména *Bacteria* (Tortoli *et al.*, 2019)

## 2 CHARAKTERISTIKA RODU *MYCOBACTERIUM*

### 2.1 OBECNÁ MORFOLOGIE

Mykobakterie jsou aerobní až na výjimky, které jsou schopné růst v atmosféře se sníženým obsahem kyslíku. Nesporulující, nepohyblivé, lehce zakřivené nebo rovné tyčky (Van Crevel *et al.*, 2017). Mohou se vyskytovat i jako snadno se rozpadající vlákna, která připomínají mycelium. Tvar buněk může záviset na druhu kultivační půdy a stáří kultury (Sedláček *et al.*, 2007).

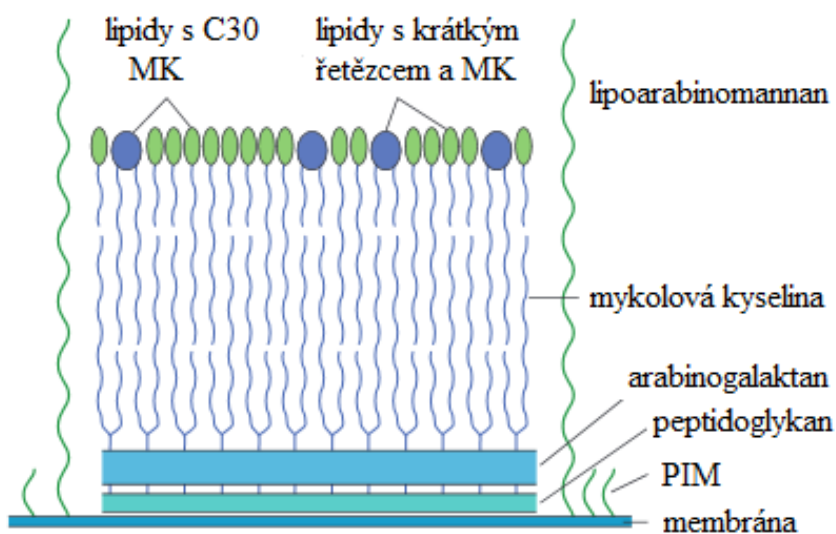


**Obrázek 1** *Mycobacterium tuberculosis*, původce TBC (Janice Carr, 2006)

#### 2.1.1 BUNĚČNÁ STĚNA

Nejdůležitějším znakem odlišující mykobakterie je obsah lipidů v buněčné stěně, z tohoto důvodu se jim říká acidorezistentní tyčky. Jsou odolnější vůči odbarvení. Při barvení karbolfuchsinem je lze odbarvit zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Téměř se nebarví podle Grama, a proto jsou označovány jako Gram neutrální (Van Crevel *et al.*, 2017).

Složky buněčné stěny určují velikost a tvar bakterií, chrání vůči osmotickému tlaku a škodlivým molekulám z vnějšího prostředí (Van Crevel *et al.*, 2017). Hydrofobní část buněčné stěny chrání bakterie před působením chemoterapeutik. Umožňuje transport molekul, živin, iontů a metabolitů buňky (Bailo *et al.*, 2015).



**Obrázek 2 Mykobakteriální buněčná stěna** (Van Ingen, 2014)

Buněčnou membránu tvoří fosfolipidová dvojvrstva s membránovými a transmembránovými proteiny. Na vnější membránu je vázána tenká vrstva peptidoglykanu, který je kovalentně vázán na arabinogalaktan (Bailo *et al.*, 2015). Spolu s peptidoglykanem na buněčnou stěnu nasedá lipoarabinomannan (LAM) a PIM. Na arabinogalaktan se váže mykolová kyselina. Vnější buněčnou stěnu uzavírá hydrofobní dvojvrstva lipidů s mastnými kyselinami (MK) (Van Ingen, 2014).

### 2.1.2 RYCHLOST RŮSTU

Generační doba mykobakterií je oproti jiným bakteriálním druhům delší. Rychlost růstu jedné generace je od 12 do 24 hodin, proto kultivace trvá v průměru 8 týdnů (Caulfield *et al.*, 2016).

### 2.1.3 PRODUKCE PIGMENTŮ

Mykobakterie mohou tvořit pigmenty žluté až oranžové barvy. Skotochromogenní mykobakterie tvoří pigment i bez přítomnosti světla, fotochromogenní produkují pigment až po expozici kolonií na světle. Všechny mykobakterie patřící do skupiny MTBC jsou

nechromogenní. Neprodukují žádný pigment, kolonie mají smetanově hnědou barvu. Přítomnost barevného pigmentu poukazuje na růst NTM (Caulfield *et al.*, 2016).

**Tabulka 1 Charakter růstu, pigmentace a patogeneze mykobakterií (Votava *et al.*, 2003)**

PŘEHLED ČASTĚJI SE VYSKYTUJÍCÍCH MYCOBACTERIÍ			
skupina	druh	pigmentace	patogenita pro člověka
pomalu rostoucí	komplex <i>M. tuberculosis</i> :		
	<i>M. tuberculosis</i>	N	tuberkulóza
	<i>M. africanum</i>	N	TBC v tropické africe
	<i>M. bovis</i>	N	TBC krčních uzlin
	<i>M. bovis</i> BCG	N	vakcinační kmen
	komplex <i>M. avium</i> :		
	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	N	pneumonie a lymfadenitidy
	<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	N	Crohnova choroba
	<i>M. intracellulare</i>	N	pneumonie a lymfadenitidy
	<i>M. kansasii</i>	F	chronická onemocnění plic
	<i>M. marinum</i>	F	kožní granulomy
	<i>M. ulcerans</i>	N	tropický ulcer Buruli
<i>M. xenopi</i>	S	vzácně pneumonie	
	<i>M. gordonae</i>	S	většinou pouhá kontaminace
rychle rostoucí	<i>M. fortuitum</i>	N	infekce ran, osteomyelitidy
	<i>M. chelonae</i>	N	kožní léze při imunosupresi
	<i>M. smegmatis</i>	S	infekce tkání po poranění
	<i>M. abscessus</i>	N	chronické infekce plic a ran
nerostoucí <i>in vitro</i>	<i>M. leprae</i>	—	malomocenství

*Legenda: N = nechromogenní, F = fotochromogenní, S = skotochromogenní*



## 2.2 PATOGENEZE A PATOGENITA

Mykobakteriální infekce vzniká vdechnutím aerosolu při blízkém kontaktu s nemocnou osobou. Po vstupu do organismu vzniká LTBI. Jedinci jsou infikováni, ale nejsou přítomny žádné příznaky a nedochází k přenosu na další osoby. Z latentního stádia 5 až 10 % případů přechází do aktivního onemocnění (Fogel, 2015).

Hlavním faktorem virulence mykobakterií je schopnost odolat a replikovat se v makrofázích hostitele. Do makrofágů mykobakterie vstupují pomocí fagocytózy. Při zrání fagolysozomu jsou bakterie vystaveny antimikrobiálním faktorům. Například kyslíkovým meziproductům, hydrolytickým aktivitám a velmi kyselému pH. Virulentní mykobakterie jsou schopny zastavit zrání fagolysozomu, inhibují kyselé prostředí a dokáží uniknout z fagolysozomu do cytoplazmy (Van Ingen, 2017).

Hlavní imunitní odpovědí hostitele na infekci NTM je tvorba granulomů. Jejich velikost a struktura závisí na stavu imunity hostitele (Van Ingen, 2017).

Riziku vzniku aktivního onemocnění mohou být vystaveni pacienti s rakovinou nebo pacienti užívající imunosupresiva (Fogel, 2015). U imunodeficitních pacientů, nejvíce u AIDS, častěji vznikají infekce NTM. Zejména komplexem *M. avium* (Van Ingen, 2017). Prevalenci mohou mít i diabetici, kteří nedbají na kontrolu hladiny glykémie (Martinez, 2017). Vzácněji může dojít k infekci MTBC u pacientů s cystickou fibrózou (Patil *et al.*, 2015).

## 3 KLINICKY VÝZNAMNÉ DRUHY

### 3.1 *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

*M. tuberculosis* je původcem lidské tuberkulózy a je první příčinou úmrtí spojeného s jediným patogenem na celém světě (Bañuls *et al.*, 2015).

Na Middlebrookově agaru vyrůstá *M. tuberculosis* při teplotě 35 °C za 2-3 týdny. Kolonie jsou béžové, drsné, suché s nepravidelnými okraji. Na vaječném médiu jako například L-J půda nebo Ogawa jsou kolonie bradavičnaté až granulární, starší kolonie mají vzhled kvěťáku (Van Crevel *et al.*, 2017). V tekuté půdě tvoří krupicovitý sediment (Votava *et al.*, 2003).



Obrázek 3 *M. tuberculosis* na Löwenstein-Jensenově půdě (George Kubica, 2011)

#### 3.1.1 CORD FAKTOR

Cord faktor je známý jako hlavní faktor virulence *M. tuberculosis* (Votava *et al.*, 2003). Jde o trehaloso-6,6'- dimykolát. Poprvé růst mykobakterií v hadovitých provazcích popsal Middlebrook v roce 1947. Provazce byly spojovány s *M. tuberculosis* a její virulencí. Dnes je zřejmé, že tyto znaky mají i jiné druhy mykobakterií (Van Crevel *et al.*, 2017).

### 3.2 *MYCOBACTERIUM AVIUM* KOMPLEX

Běžně se vyskytuje v půdě, vodě, u zvířat a v rozvodech teplé vody (Van Ingen, 2017). Zahrnuje druhy *M. avium* a *M. intracellulare*, nejsou odlišitelné běžnými testy a jejich patogenita je totožná (Votava *et al.*, 2003).

Možnosti infekce jsou plicní a gastrointestinální po požití infikované vody nebo vdechnutím aerosolu. Při přímém kontaktu infikuje i otevřené rány (Van Ingen, 2017). V souvislosti s AIDS působí závažná diseminovaná onemocnění s velkým počtem mykobakterií ve tkáních. Jsou rezistentní na většinu antituberkulotik (Votava *et al.*, 2003), proto je léčba často komplikována nepříznivými účinky. Míra recidivy může být 25% až 45% (Lande *et al.*, 2018).

Navzdory všudypřítomnosti MAI-C v životním prostředí se onemocnění vyskytuje u relativně malého počtu infikovaných osob (Daley *et al.*, 2017).

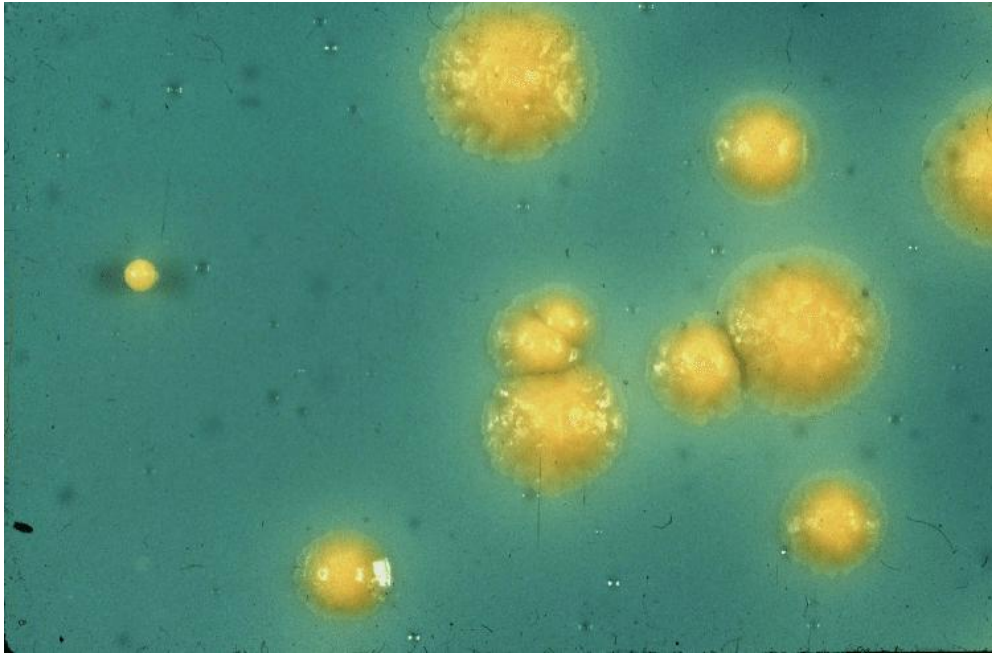


Obrázek 4 *M. avium* na Middlebrookově agaru, dvě nejčastější morfologie kolonií (béžové neprůhledné a menší průsvitné) (Van Ingen *et al.*, 2017)

### 3.3 *MYCOBACTERIUM MARINUM*

Mezi netuberkulózními mykobakteriemi je hlavní příčinou mimoplicních infekcí u lidí po celém světě. Je původcem jizevnaté kožní infekce známé jako plovárenský granulom. *M. marinum* způsobuje tuberkulózu u ryb. Při mikrobiologické kultivaci vyrůstá za 7 až 14 dnů, kolonie jsou fotochromogenní. Teplota kultivace nesmí překročit 30°C, z toho důvodu bývá kultivace při běžné teplotě 37°C negativní. Prevence je užitečná, doporučuje se ochrana rukou

pro profesionály a všechny osoby, které manipulují s rybami anebo vodou z akvárií. Po kontaktu se používají dezinfekce na bázi alkoholu (Aubry *et al.*, 2017).



**Obrázek 5** Fotochormogenní *Mycobacterium marinum* (Aubry Alexandra, 2017)

### **3.4 MYCOBACTERIUM XENOPI**

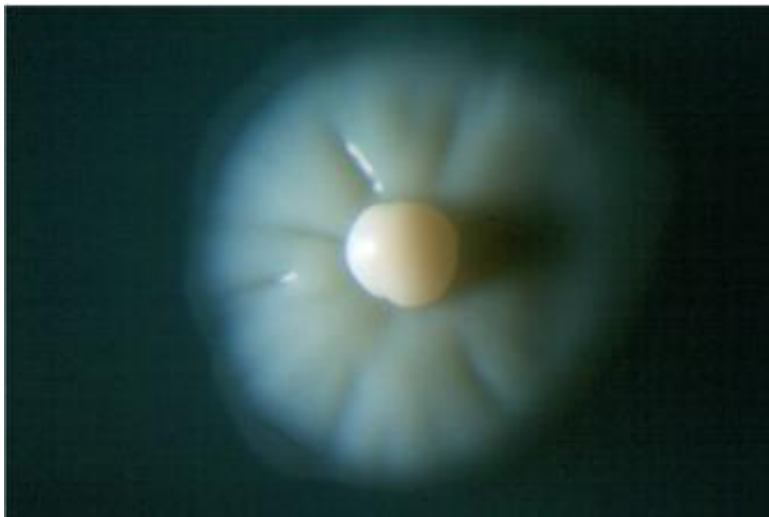
Pomalu rostoucí, netuberkulózní mykobakterie, považována za oportunně patogenní (Habib *et al.*, 2018). Je často izolováno z vodovodních systémů, hlavně v teplé vodě (Votava *et al.*, 2003). Náročné na kultivaci (Habib *et al.*, 2018), roste pomalu na pevných půdách s teplotním optimem 40 až 45 °C, kde tvoří drobné žlutě pigmentované kolonie (Bednář *et al.*, 1996).

K infekci obvykle dochází při vdechnutí aerosolu. Většina případů je klinicky významná. Způsobuje plicní onemocnění i extrapulmonální infekce, kdy může postihnout kosti a klouby (Habib *et al.*, 2018). *M. xenopi* bylo poprvé izolováno u pacientů s imunosupresí. Hlavní rizikové faktory onemocnění mohou být chronická plicní onemocnění (Martín Asenjo *et al.*, 2017).

### 3.5 *MYCOBACTERIUM FORTUITTUM*

Podmíněně patogenní, rychle rostoucí mykobakterie. Mikroskopicky jde o polymorfní, často vláknité a neúplně acidorezistentní tyčky. Rozsah teploty pro kultivaci je 25 až 45 °C. Na pevných půdách vyrůstá po 5 až 10 dnech ve formě šedých kolonií, v tekutých médiích naopak tvoří sediment a zákal (Bednář *et al.*, 1996).

*M. fortuitum* přežívá v prostředí za různých podmínek. Díky tvorbě biofilmu je rezistentní vůči chlorovaným dezinfekčním prostředkům, a proto je často izolované v nemocničních prostředích. Může se podílet i na kontaminaci zdravotnického vybavení (Campos-Gutiérrez *et al.*, 2019). Způsobuje plicní, kožní a pooperační infekce, není běžná u lidí s infekcí HIV (Van Ingen, 2017).



Obrázek 6 *M. fortuitum*, nechromogenní, rychle rostoucí na Middlebrookově agaru (Van Ingen *et al.*, 2017)

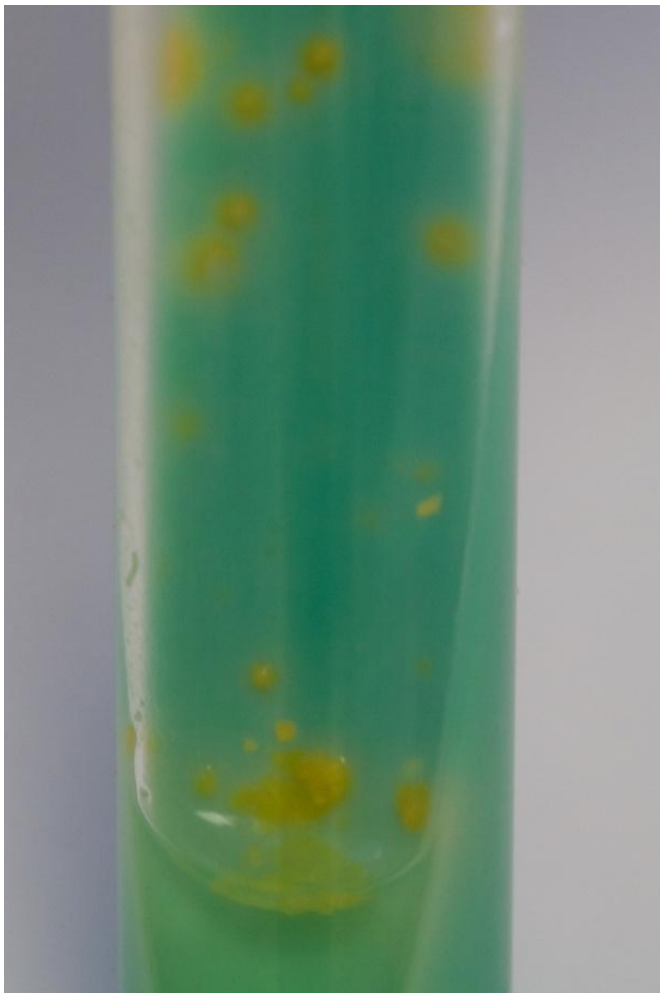
### 3.6 *MYCOBACTERIUM ABSCESSUS* KOMPLEX

Patří mezi rychle rostoucí, netuberkulózní mykobakterie. Je zodpovědné za různá onemocnění kůže i měkkých tkání, infekcí CNS, bakteriémie a jiné oční infekce. Komplex *M. abscessus* může dále způsobit plicní onemocnění, zejména u oslabených hostitelů (Meng-Rui *et al.*, 2015). Komplikuje onemocnění u pacientů s cystickou fibrózou (Van Ingen, 2017).

Je běžně rezistentní na většinu antituberkulotik. Při léčbě je možné podávat anti-TB jen intravenózně (Van Ingen, 2017).

### 3.7 *MYCOBACTERIUM KANSASII*

Netuberkulózní mykobakterie velmi zřídka izolována z přírodních vodních zdrojů nebo půdy. Hlavním zdrojem bývá vodovodní potrubí. K přenosu dochází formou aerosolu, avšak s nízkou infekčností (Johnston *et al.*, 2017). *M. kansasii* je celkem snadno rozpoznatelné na základě své charakteristické fotochromogenity, kdy při vystavení světlu vytváří žlutý pigment (Akram *et al.*, 2019). Na pevných půdách se kultivuje 3 až 6 týdnů při teplotě 30–37 °C. V tekutých půdách roste ve formě vločkovitého sedimentu (Bednář *et al.*, 1996). Ve světelném mikroskopu se jeví jako tlusté tyčinky. Z klinického hlediska způsobuje chronické kavitární onemocnění horních laloků, které připomíná onemocnění způsobované *M. tuberculosis* (Akram *et al.*, 2019). Je méně často spojováno s dětskou lymfadenitou (Van Ingen, 2017).



**Obrázek 7** *Mycobacterium kansasii* na LJ půdě (Reading Nathan, 2010)

## 4 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Diagnostikovat tuberkulózu je obtížná záležitost, mohou ji ovlivnit některé faktory. Například nedostatek mikroorganismů v kultuře, pomalý růst kultury, chybějící nebo nesprávně vyložené rentgenové nálezy hrudníku či, záměna příznaků tuberkulózy s již existujícím onemocněním (Lyon *et al.*, 2017).

Konečná diagnostika tuberkulózy vždy vyžaduje bakteriologické potvrzení. Pozitivní mikroskopický nálezy nemusí být specifický pro *M. tuberculosis*, může jít o jiné acidorezistentní mykobakterie. Jediným způsobem potvrzení diagnózy je pozitivní kultivace (Lyon *et al.*, 2017).

### 4.1 DRUHY MATERIÁLU

Nejčastější vzorek pro diagnostiku plicní infekce MTBC i NTM je sputum. Pro zvýšení citlivosti vyšetřovacích metod je doporučeno odebírat tři vzorky s minimálním časovým rozstupem 8 hodin. Ranní sputum je pro odběr nejvhodnější, protože ve spánku dochází k hromadění mykobakterií v hleny (Caulfield *et al.*, 2016). Lze odebrat i jiný respirační materiál, výtěry a výplachy dutin, pleurální punktát, biopsie kůže, lymfatických uzlin, moč, stolici i likvor. Lze použít i stěry z ložiska infekce. Ty se provádí dvěma zvlhčenými tampony ve sterilní destilované vodě nebo fyziologickém roztoku. Mohou být i ponořeny do těchto roztoků (Amlerová *et al.*, 2014).

Krev je odebírána do zkumavek obsahující heparin nebo citrát, EDTA není příliš vhodná. Krev pro kultivaci lze zpracovat v systémech BACTEC Myco / F Lytic nebo BacT / ALERT MP (Caulfield *et al.*, 2016).

#### 4.1.1 ODBĚR MATERIÁLU

Nejvhodnějším vzorkem pro kultivaci a mikroskopii je čerstvě vykašlané sputum. Sputum, které je starší, než 24 hodin od odběru, bývá méně vhodné, neboť je v něm pomnožena flóra dutiny ústní. Pokud pacient nedokáže vykašlat hlen samovolně, přistupuje se k odběru indukovaného sputa. To lze získat inhalací aerosolu izotonického nebo

hypertonického roztoku soli. Inhalace probíhá v časovém rozmezí 5 až 15 minut (Lyon *et al.*, 2017).

Pokud se ani tímto postupem nepodaří získat vzorek, můžeme provést nátěr kultury získané výplachem žaludku. Tyto vzorky jsou méně kvalitní z hlediska možného výskytu netuberkulózních mykobakterií z potravy (Lyon *et al.*, 2017). Tento postup je možné použít i u dětí a kojenců, kteří neumí sputum vykašlat nebo jej polykají (Caulfield *et al.*, 2016).

V některých situacích se musí přistoupit k bronchoskopii. Lokální anestetika používaná při zákroku mohou být smrtelná pro *M. tuberculosis*. Vzorky pro kultivaci by tedy měly být získávány s minimálním množstvím anestetik. Při samotné proceduře odběru může dojít k podráždění bronchiálního stromu, což může u pacienta vést k vyvolání produktivního kašle. Lze potom odebrat takzvané postbronchoskopické sputum. I to může být použito k diagnóze (Lyon *et al.*, 2017).

Při TBC kůže lze biopticky odebrat vzorek, který se odebírá z aktivní části léze. Při větším počtu odebraných vzorků je lze nechat podrobit mnohým vyšetřením, a to histopatologickému, mikroskopickému zhodnocení, kultivaci i pro rychlou PCR diagnostiku (Afsar *et al.*, 2016).

#### **4.1.2 PŘÍJEM A ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU**

Vzorky pro vyšetření musejí být odebírány ještě před zahájením antimikrobiální léčby. Do laboratoře je nutno vzorky dopravit během jednoho dne, aby mohly být co nejrychleji zpracovány.

Pro minimalizaci poškození nebo znehodnocení vzorku je nutné materiál uchovávat v lednici, kromě krve (Amlerová *et al.*, 2014). Kvůli zachování viability mykobakterií z polykaného hlenu je třeba u výplachů žaludku neutralizovat žaludeční šťávy hydrogen uhličitánem sodným. Neutralizace se nemusí provádět u vzorků, které budou zpracovány do 4 hodin od odběru (Caulfield *et al.*, 2016) Stěry a výtěry se neukládají do transportních médií, mohou však být vloženy do fyziologického roztoku nebo sterilní destilované vody. Bioptický materiál se nefixuje ani nekonzervuje. Aby nedošlo, k jeho vyschnutí je možné přidat sterilní destilovanou vodu (Amlerová *et al.*, 2014).



## 4.2 PRAVIDLA PRÁCE S BAKTERIÍ RODU *MYCOBACTERIUM*

MTBC s výjimkou kmene BCG patří do 3 skupiny biologických činitelů a jiné NTM jsou řazeny do skupiny 2 (Nařízení vlády č. 361/2007 Sb., nařízení vlády, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci).

Biologičtí činitelé skupiny 3 představují pro zaměstnance omezené riziko vzniku nákazy. Pokud se za běžných podmínek nepřenášejí vzduchem, jsou na zaměstnance a pracoviště kladeny stejné nároky jako při práci se skupinou biologických činitelů 2 (Nařízení vlády č. 361/2007 Sb., nařízení vlády, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci).

Odběry vzorků musejí být prováděny asepticky a žádanka musí být od vzorků oddělena. Materiál je zpracováván z hlediska vzniku infekčního aerosolu v biohazardním boxu. Používají se dezinfekční prostředky s mykobaktericidním a tuberkulocidním účinkem, které odpovídají požadavkům norem (Amlerová *et al.*, 2014).

## 4.3 DEKONTAMINACE A HOMOGENIZACE VZORKU

Vzorky jsou před dalším zpracováním dekontaminovány a homogenizovány. Sputum při odběru prochází přes orofarynx a dochází tak ke kontaminaci běžnou bakteriální florou (Karakeçe *et al.*, 2014). Dekontaminace není nutná u vzorků, které byly sterilně odebrány, nebo se nepředpokládá příměs jiných mikroorganismů. Takovým vzorkem může být například likvor nebo punktáty (Amlerová *et al.*, 2014).

Rutinní dekontaminace mají i své nevýhody. Může dojít k usmrcení mnoha mykobakterií. Postupy jsou dlouhé a náročné. Při manipulaci se vzorky může dojít k nechtěné kontaminaci jinými bakteriemi (Karakeçe *et al.*, 2014).

Homogenizace probíhá v třepačce. Vzorky tkání se nakrájí skalpelem na malé kousky a rozmělní se ve sterilní třecí misce či za použití homogenizátoru. Před dekontaminací se do fyziologického roztoku vytřepávají stěry a výtěry. Některé vzorky jako stolice nebo hnis se fyziologickým roztokem pouze promývají (Amlerová *et al.*, 2014).

### **4.3.1 PETROFFOVA MODIFIKOVANÁ METODA**

Jedná se o metodu sloužící k dekontaminaci materiálu například sputa. K 4 ml vzorku se přidají 4 ml 4% roztoku NaOH, směs se homogenizuje 15 minut ve třepačce a dalších 20 minut se inkubuje při 37 °C. Po inkubaci se zkumavka centrifuguje 15 minut při 3000 ot./min. Supernatant je vylit do roztoku desinfekce (Muddaiah *et al.*, 2013). Sediment se neutralizuje 1M HCl (Franco-Sotomayor *et al.*, 2020) a resuspenduje se v 15 ml SVD. Opět se centrifuguje za stejných podmínek. Supernatant se odstraní a sediment je připraven pro následující zpracování (Muddaiah *et al.*, 2013).

### **4.3.2 ZPRACOVÁNÍ PRO PCR**

Pro detekci DNA bakterií ve vzorku je nutné provést dekontaminaci 4% roztokem NaOH. Jednu minutu je vzorek homogenizován v třepačce. Po 15 minutách dekontaminace je 1 ml směsi přenesen do sterilní zkumavky k centrifugaci. Supernatant je odstraněn, peleta je promyta 1 ml fosfátového pufru. Přidá se extrakční činidlo (100 µl) a homogenizuje se po dobu jedné minuty. K denaturaci molekuly DNA dojde při zahřátí vzorku na 94 až 98 °C po dobu 20 až 30 sekund. Po centrifugaci je pro testování použit supernatant (Lim *et al.*, 2019).

## **4.4 KULTIVACE**

Kultivace probíhá na pevných médiích na bázi vajec nebo agaru a v tekutých médiích (Caulfield *et al.*, 2016).

### **4.4.1 TEKUTÉ PŮDY**

V tekutých médiích dochází k pomnožení mykobakteriální kultury rychleji než na pevném médiu a to zhruba do 10 dní, pevná od 20 do 25 dní. Tekutá media se dnes kultivují v automatických systémech (BACTEC MGIT 960, systém Versa TREK a MB BACT/ALERT (Caulfield *et al.*, 2016). Jejich obsluha i kultivační teplota se řídí návodem výrobce, dobu kultivace lze prodloužit (Amlerová *et al.*, 2014).

System MGIT 960 identifikuje nárůst mykobakterií nepřetržitým měřením fluorescence zkumavek. Zkumavky obsahují modifikované Middlebrookovo medium (Caulfield *et al.*, 2016) obohacené o kyselinu olejovou, albumin, dextrózu, katalázu (Srisuwanvilai *et al.*, 2008) a fluorescenční indikátor. K fluorescenci dochází spotřebou kyslíku v médiu rostoucími mykobakteriemi (Caulfield *et al.*, 2016).

Vzorky jsou inkubovány při teplotě 37 °C po dobu až 42 dnů. Automatický systém MGIT 960 kontroluje zkumavky každou hodinu. Pokud dojde ke zvýšení fluorescence je vzorek pozitivní a provede se nátěr kultury na podložní sklíčko k mikroskopické kontrole. Pokud se v nátěru nenacházejí ART, zkumavka se vrátí do přístroje a pokračuje se v inkubaci až do 42 dne (Srisuwanvilai *et al.*, 2008).

#### **4.4.2 PEVNÉ PŮDY**

Pevná půda je například Löwenstein-Jensenova. Půda obsahuje vaječný protein, bramborovou mouku, sůl a glycerol. L-J medium podporuje růst MTBC, růst jiných mykobakterií nemusí být tak kvalitní. Lze využít i média založená na bázi agaru. Ta jsou však méně stabilní a rychleji se zhoršuje jejich kvalita. Při vyšších teplotách mohou uvolňovat formaldehyd, který může inhibovat růst bakterií. Taková média jsou například Middlebrook 7H10, 7H11 (Caulfield *et al.*, 2016) nebo Ogawa (Amlerová *et al.*, 2014).

Očkování na půdu Ogawa metodou tamponu se od Petroffovy metody liší provedením. Do vzorku sputa nebo jiného extrapulmonálního materiálu je namočen sterilní vatový tampon. Následně je ponořen na 2 minuty do zkumavky se 4% roztokem hydroxidu sodného. Tamponem se přímo inokuluje na půdu Ogawa. Ta má kyselější pH (6,4 až 6,6), protože zpracování materiálu nemá krok neutralizace kyselinou (Franco-Sotomayor *et al.*, 2020).

Každý vzorek se očkuje na 2 L-J půdy a inkubují se při 37 °C (Muddaiah *et al.*, 2013). Odečet probíhá po 3, 6, 9 a případně 12 týdnech (Amlerová *et al.*, 2014).

NTM, které způsobují infekce kůže nebo lymfatických uzlin se inkubují při teplotách 28–30°C (Srisuwanvilai *et al.*, 2008). *M. xenopi* je termofilní a kultivuje se při 45 °C (Amlerová *et al.*, 2014).

## 4.5 TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI

Provádí se u každého nově izolovaného kmene MTBC a u indikovaných případů NTM. Citlivost se zjišťuje u základní řady antituberkulotik. V případě rezistence i u jiných léčiv, jako například fluorochinolony, kanamycin a amikacin (Amlerová *et al.*, 2014).

### 4.5.1 PROPORČNÍ METODA DLE CANETTIHO

Metoda se provádí ve zkumavkách na L-J mediu. Jedna testovací řada zahrnuje půdu bez přidaných léčiv. Slouží ke kontrole růstu bakterií. V dalších zkumavkách jsou, léčiva obsažena v jejich kritických koncentracích, což je nejnižší inhibiční koncentrace daného antituberkulotika. Základní anti-TB a jejich kritické koncentrace: INH 0.2 mg/l, RIF 40 mg/l, STM 4 mg/l, EMB 2 mg/l, PZA 400 mg/l. Testovací řada může být v případě potřeby rozšířena i o další antituberkulotika (Amlerová *et al.*, 2014).

Půdy se kultivují v teplotním optimu daného kmene, odečítání probíhá obvykle po 3 – 4 týdnech. Kontrolní zkumavka musí vyjít pozitivní, jinak nelze test hodnotit. V případě opakování testu se nanáší silnější inokulum (Amlerová *et al.*, 2014).

## 4.6 MIKROSKOPIE

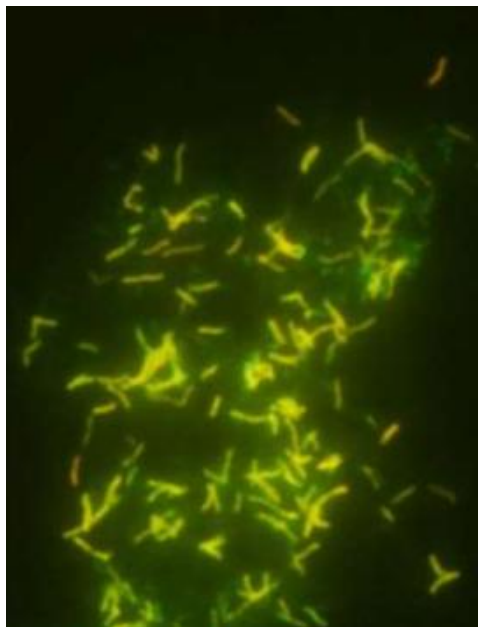
Je rychlá a levná metoda na prokázání mykobakterií z klinického vzorku. Nátěry lze hodnotit ve světelném mikroskopu nebo fluorescenčním. Pro spolehlivou detekci pozitivního vzorku musí sputum obsahovat alespoň 1000 až 10 000 CFU/ml (Caulfield *et al.*, 2016).

### 4.6.1 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Tato metoda je nákladnější než světelná mikroskopie. Může dojít k vyhoření drahých rtuťových výbojek. Celý mikroskop musí být umístěn v tmavé místnosti a musí být nepřetržitě pod elektrickým napětím (Singhal, 2015). Výhodou metody je však větší citlivost a rychlejší prohlížení preparátu, oproti světelné mikroskopii (Caulfield *et al.*, 2016).

Auramin a rhodamin jsou fluorescenční barviva, používaná ve fluorescenční mikroskopii k barvení preparátů. Připravené barvicí směsi fluorochromů a hotové obarvené

preparáty je nutno chránit před světlem. Barvicí roztok se skládá z auraminu, rhodaminu a sterilní destilované vody. Používá se také odbarvovací a dobarvovací roztok. Odbarvovací se skládá z roztoku NaCl, koncentrované HCl a lihobenzínu. Dobarvovací roztok obsahuje směs barviva kyselého fuchsinu, koncentrovanou HCl a SDV (Amlerová *et al.*, 2014).

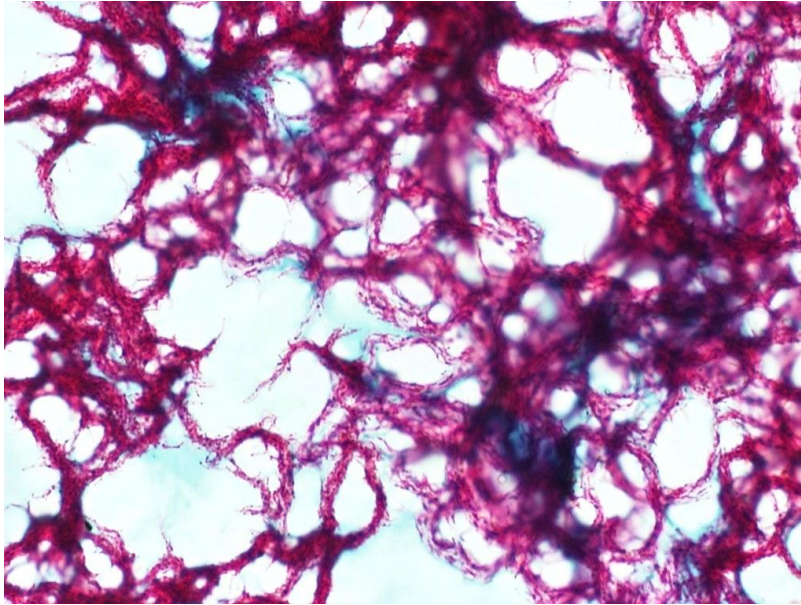


**Obrázek 8** Nátěr acidorezistentních bakterií obarvený fluorescenčním barvením auramin-rhodamin (Caulfield *et al.*, 2016)

#### 4.6.2 SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE

Nátěry se připravují na čistá podložní sklíčka. Materiál se roztírá sterilní bakteriologickou kličkou na plochu přibližně 2×3 cm. Preparáty schnou na vzduchu přibližně 15 minut. Fixování suchého preparátu se provádí 3× protažením v plameni kahanu. Po fixaci se barví preparáty příslušným barvením. Příprava preparátu je stejná i pro barvení fluorochromy (Jaya Chandra *et al.*, 2015).

Při barvení dle Ziehl-Neelsova za tepla se používá roztok kalbofuchsinu, který se připravuje smícháním krystalického fuchsinu, lihobenzínu a krystalického fenolu. Odbarvovací roztok se skládá z koncentrované HCl a lihobenzínu. Dobarvovací směs obsahuje 1% vodný roztok malachitové zeleně nebo metylenové modře a SVD (Amlerová *et al.*, 2014).



**Obrázek 9 Čistá kultura *M. tuberculosis* barvení dle Ziehl-Neelsova (Gaião, 2015)**

Další možnou barvicí metodou pro světelnou mikroskopii je dle Kinyouna za studena. Složení barvicí řady je až na výjimku u barvicí směsi karbolfuchsinu stejné. Zde se používá bazický fuchsin a navíc i SVD. Při prvním kroku barvení se nezahřívá, pouze se nechá působit barvivo 5 minut, odbarvovací a dobarvovací roztoky působí jen 1 minutu. Mezi jednotlivými kroky je vždy oplach vodou (Amlerová *et al.*, 2014).

#### **4.6.3 HODNOCENÍ PREPARÁTU**

Preparáty barvené metodou dle Ziehl-Neelsova nebo dle Kinyouna se hodnotí v 50 zorných polích, imerzním objektivem, při celkovém zvětšení 1000× (Amlerová *et al.*, 2014).

- 0 = ART nenalezeny
- 1 – 9 = ART ojediněle
- 10 – 20 = +
- 21 – 100 = ++
- 101 a více = +++

Preparáty barvené auraminem-rhodaminem se hodnotí v 25 zorných polích, při celkovém zvětšení 200× až 400×. Při menším zvětšení lze prohlédnout větší plochu preparátu (Amlerová *et al.*, 2014).

- 0 = ART nenalezeny
- 1 – 4 = ART ojediněle
- 5 – 20 = +
- 21 – 100 = ++
- 101 a více = +++

I když pozitivní mikroskopický nátěr poukazuje na výskyt mykobakterií ve vzorku nelze určit diagnózu pouze z tohoto vyšetření. Mikroskopický nátěr má totiž nízkou citlivost. Pro určení diagnózy musí být mikroskopie kombinována s kultivací a testováním citlivosti na antituberkulotika (Caulfield *et al.*, 2016).

## 4.7 MOLEKULÁRNÍ METODY

Používanou molekulární metodou k detekci mykobakterií je real-time PCR. Na rozdíl od normální PCR je možnost sledovat výsledky v reálném čase. PCR slouží k namnožení námi zvoleného úseku pomocí primeru (Lim *et al.*, 2019). Kroky PCR jsou denaturace, amplifikace a elongace. Při denuraci dochází k rozvolnění struktury DNA. Při amplifikaci námi zvolené primery, fragmenty DNA, nasedají na specifické úseky DNA. Pomocí termostabilní polymerázy jsou syntetizovány nová vlákna DNA (Chae *et al.*, 2017).

PCR v reálném čase probíhá v termocykleru. V detekčním zařízení se snímá fluorescenční záření fluoroforu (Lim *et al.*, 2019).

Pro detekci komplexů mykobakterií, nebo jen jednoho druhu lze použít specifické primery. Pro určení rodu *Mycobacterium* se používá 16S rRNA gen. K detekci MTBC lze použít primer rv0577, kterým komplex odlišíme od jiných NTM. Specifické geny se používají i k detekci jednotlivých druhů mykobakterií. Například k detekci *M. abscessus* (mass\_3210), *M. kansasii* (mkan\_rs12360) a *M. avium* a *M. intracellulare* IS 1311 a DT1 (Chae *et al.*, 2017).

### 4.7.1 RYCHLÝ MOLEKULÁRNÍ TEST GeneXpert

Jde o test amplifikace nukleových kyselin na bázi kazet. Probíhá zde detekce DNA bakterií způsobující TBC a testuje i rezistenci na rifampicin. Princip je založen na ultracitlivé PCR technice.

Před zahájením samotné léčby pacienta je vhodné provést test. Výsledky jsou pak známy do 2 hodin. WHO doporučuje testování pacientů s podezřením na MDR tuberkulózu nebo u HIV pozitivních. Nenahrazuje ovšem sledování léčby, jelikož detekuje i mrtvé bakterie (Shah *et al.*, 2020).

### 4.7.2 MALDI-TOF-MS

Rychlá a přesná metoda pro identifikaci bakterií na rodové, druhové popřípadě i kmenové úrovni. (Huong *et al.*, 2014).

Po ozáření krystalické matrice a vzorku laserem dochází k desorpci a ionizaci jejich molekul. Aplikací napětí mezi destičku a hmotnostní analyzátor dojde k extrakci nabitých molekul. Rychlost je úměrná hmotnosti a náboji molekul. Detektor po dopadu každé nabitě částice vypočítá její hmotnost (Huong *et al.*, 2014). Každý systém využívá svou vlastní databázi pro identifikaci bakterií. Databáze nemusí obsahovat méně běžné bakterie, což omezuje spolehlivost identifikace (Caulfield *et al.*, 2016). Knihovna MTB pro mykobakterie na platformě Bruker Daltonic obsahuje záznam o 164 ze 180 známých druhů mykobakterií (Huang *et al.*, 2018).

Vhodnými matricemi pro UV lasery jsou aromatické kyseliny rozpuštěné ve vodním roztoku acetonitrilu, etanolu nebo metanolu. Podle druhu použité matrice dochází k odlišné ionizaci a krystalizaci látek. Nejpoužívanější matricí je DHB. Ta dobře ionizuje peptidy, proteiny, sachariny i nukleové kyseliny (Huong *et al.*, 2014).



## 4.8 IGRA TESTY

Jedná se o testy na zjištění imunitní odpovědi T-lymfocytů kde je měřeno uvolňování interferonu gamma. Jde o zánětlivý cytokin vznikající po stimulaci antigeny produkovanými MTBC vyjma BCG kmene. Produkován je i některými NTM (*M. marinum*, *M.kansasii*). Mezi tyto antigeny patří ESAT-6 a CFP-10. IGRA testy lze provést na přístrojích QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay a T-SPOT.TB Assay (Pai *et al.*, 2017).

QuantiFERON-TB Gold In-Tube test slouží k detekci LTBI (FN HK, 2020). Antigeny ESAT-6 a CFP-10 jsou navázány na vnitřní stěnu zkumavek. Přidá se heparinizovaná plná krev a proběhne inkubace (Pai *et al.*, 2017) v odběrové zkumavce spolu s antigeny nebo kontrolami (Lempp *et al.*, 2017). Pozitivní kontrola obsahuje fytohemaglutinin, negativní jej neobsahuje (Niguse *et al.*, 2018). Aby odezva byla přesná, je nutné mít čerstvou krev obsahující živé bílé krvinky, které produkují IFN- $\gamma$ . K měření uvolněného množství IFN- $\gamma$  po reakci s antigeny se využívá metoda ELISA (Lempp *et al.*, 2017).

T-SPOT-TB je enzymově vázaný immunospot. Testují se separované periferní mononukleární buňky. Ty jsou inkubovány s peptidy (ESAT-6 a CFP-10) (Pai *et al.*, 2017). Buňky po stimulaci produkují IFN- $\gamma$ , který je monoklonální protilátkou zachycen na dno testovací jamky. Zde je jako barevný spot kvantifikován čtecím zařízením (FN HK, 2020).

## **5 MOŽNOSTI TERAPIE A PREVENCE ONEMOCNĚNÍ**

### **5.1 TERAPIE**

Léčba TBC má docílit vyléčení pacienta, zachování kvality jeho života a produktivity. Cílem je také zabránit smrti, relapsu onemocnění a minimalizovat šíření TBC či vznik rezistence (Wallenfels *et al.*, 2018).

#### **5.1.1 PROCES LÉČBY**

Tuberkulóza se léčí dlouhodobě, pomocí kombinovaných léčiv a pod dozorem zdravotnického personálu. Antituberkulotika se podávají minimálně po dobu šesti měsíců v jednorázových dávkách, nejlépe na lačno, aby nebyla snížena účinnost léku. Režim léčby je nutno přizpůsobit typu TBC (nově vzniklé onemocnění, recidiva, rezistence) (Wallenfels *et al.*, 2018). Léčba mimoplicní TBC probíhá také pod dohledem kompetentních odborníků např. urologů, lékařů ORL nebo ortopedů (Vašáková, 2017).

První dva měsíce je pacient hospitalizován a dostává čtyřkombinaci anti-TB. Účelem je odstranění mikroorganismů. Zbylé čtyři měsíce dochází pacient jen ambulantně, podává se už jen dvojkombinace (Wallenfels *et al.*, 2018).

Čtyřkombinace antituberkulotik obsahuje RIF, INH, PZA, EMB a dvojkombinace RIF a INH (Bailo *et al.*, 2015).

**Tabulka 2 Antituberkulotika používaná k léčbě TBC (Bailo *et al.*, 2015)**

skupina antituberkulotik	antituberkulotika
první linie	Isoniazid Rifampicin Pyrazinamid Ethambutol Rifapentin Rifabutin
druhé linie	Aminoglykosidy (Streptomycin, Kanamycin, Amikacin) Polypeptidy (kapreomycin, viomycin) Fluorochinolony Kyselina para-aminosalicylová Cykloserin Terizidone Ethionamid Prothionamid Thioacetazon Linezolid
třetí linie	Clofazimine Linezolid Amoxicilin a klavulanát Imipenem a cilastatin Clarithromycin

Nově schválenými anti-TB jsou bedaquilin a delamanid. Jsou účinná jak proti nerezistentním kmenům, tak proti kmenům MDR a XDR. Jejich nevýhodou je vysoká cena a mnohdy vznikající rezistence (Vašáková, 2017).

### 5.1.2 MECHANISMUS ÚČINKU

Rifampicin, rifambutin a jiné inhibují syntézu RNA. Isoniazid inhibuje biosyntézu mykolové kyseliny, mnohonásobné v DNA, lipidech a karbohydrátech a metabolismu NAD. Pyrazinamid způsobuje depleci buněčné membrány a energie. Etambutol inhibuje syntézu arabinogalaktanu. Streptomycin, kanamycin, amikacin a kapreomycin inhibují syntézu proteinů. Ethionamid inhibuje syntézu mykolové kyseliny. Para-aminosalicylová kyselina inhibuje metabolismus kyseliny listové a železa. Cykloserin působí na biosyntézu peptidoglykenu. Bedaquilin inhibuje syntézu ATP a linezolid syntézu proteinů (Bailo *et al.*, 2015).

### 5.1.3 REZISTENCE

Rezistence mykobakterií k léčivům může vznikat různými způsoby. Monoterapií, nepravidelným užíváním léků, nekvalitními léky, nedodržíváním léčebných postupů anebo nevyhovujícím dohledem a podporou zdravotního personálu nad pacientem. Rezistentní kmeny se mohou šířit a působit onemocněním rezistentní na anti-TB. Rozsah rezistence na léčiva definuje tři hlavní kategorie (Bailo *et al.*, 2015).

MDR jsou kmeny rezistentní alespoň na isoniazid a rifampicin (Bailo *et al.*, 2015). V letech 2009 až 2016 se každoročně zvýšil výskyt MDR-TB o vícen než 20 %, také díky rychlé diagnostice, fenotypovým a molekulárním testováním citlivosti vůči lékům (Lange *et al.*, 2018). K léčbě se používá kombinace anti-TB, v úvahu se bere infekce HIV nebo *diabetes mellitus*. Také by měl být brán ohled na předchozí léčbu pacienta a rozsah onemocnění (Campbell *et al.*, 2020). Léčba probíhá 4 až 6 měsíců s novou generací fluorochinolonu, kanamycinu, prothionamidu, isoniazidu s vysokými dávkami, clofazimin, pyrazinamid a ethambutol. Následuje pětiměsíční léčba fluorochinolonem, clofaziminem, pyrazinamidem a ethambutolem (Lange *et al.*, 2018).

XDR jsou rezistentní stejně jako MDR na isoniazid a rifampicin. Navíc nejsou citlivé na fluorochinolon (Shah *et al.*, 2020). Nejsou úplně rezistentní na kapreomycin, kanamycin a amikacin. Je-li po testování na GeneXpert izolovaný kmen na jakémkoliv toto anti-TB citlivé, mělo by být zahrnuto do léčby. Velmi silným lékem pro pacienty s XDR-TBC je Linezolid.

Má silný baktericidní účinek hlavně u kmenů rezistentních na fluorochinolon. Léčba Linezolidem dosahuje skvělých výsledků, avšak musí být neustále sledována z důvodu toxicity léku (Seaworth *et al.*, 2017).

TDR jsou kmeny rezistentní vůči všem dostupným antituberkulotikům. Počet a míra rezistence nebyla zatím definována a výskyt je velmi omezený. Mezi země, kde byl výskyt TDR zaznamenán, patří Írán, Indie, Itálie a Jižní Afrika (Bailo *et al.*, 2015).

#### **5.1.4 RECIDIVITA**

Příčinou recidivy TBC bývá pozdní zahájení léčby, při kterém dochází k uschování mykobakterií v kavitách, abscesech nebo granulomech. Tato místa jsou pro anti-TB těžko dostupná (Wallenfels *et al.*, 2018).

### **5.2 PREVENCE**

Preventivní opatření proti rozvoji TBC je očkování BCG vakcínou a léčba LTBI. Z důvodu hrozby rozvoje aktivního onemocnění (Vašáková, 2017).

Pro odhalení probíhající latentní tuberkulózní infekce je nejpoužívanější a nejběžnější tuberkulinový kožní test. Ten spočívá v aplikaci daného množství mezinárodně standardizovaného derivátu purifikovaného proteinu tuberkulinu do kůže injekční jehlou. Po 48 hodinách se v místě vpichu odečítá průměr zduření. Pod 5 mm je test negativní a nad 10 mm je pozitivní (Van Crevel *et al.*, 2017).

#### **5.2.1 OČKOVÁNÍ**

Očkování dítěte proti TBC se provádí v případě, že rodiče, sourozenec, nebo člen domácnosti měli (nebo mají) aktivní tuberkulózu. Dále, když se jedna z výše zmíněných osob zdržovala ve státě s vyšším výskytem TBC po dobu delší tří měsíců, nebo jestliže se dítě dostalo do styku s osobou s TBC (Vyhlášky č. 299/2010 Sb., vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů). Lékař dle vyplněného dotazníku zákonnými zástupci posoudí, zda je nutné dítě

očkovat. Dítě je očkováno na oddělení kalmetizace, kam je zasláno svým ošetřujícím lékařem (§ 3 Vyhlášky č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem).

Očkování dítěte staršího 6 ti týdnů se provádí pouze po provedení tuberkulinového testu s negativním výsledkem (§ 30 odst. 2 písm. b) bod 3. zákona č. 48/1997 Sb., o veřejném zdravotním pojištění).

## 6 VÝSKYT ONEMOCNĚNÍ V ČESKÉ REPUBLICE

Údaje o onemocnění TBC shromažďuje ošetřující lékař, který zahajuje léčbu. Hlášení o onemocnění TBC podává orgánu ochrany veřejného zdraví. Pokud nebyla zahájena léčba, hlášení podává lékař, který onemocnění diagnostikoval. Hlášena jsou i úmrtí na tuberkulózu (Vyhlášky č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce)

**Tabulka 3** Hlášené počty TBC v krajích ČR za rok 2017 (ÚZIS, 2018)

Území kraj	TBC celkem	kultivačně pozitivní	kultivačně pozitivní ze sputa	mikroskopicky pozitivní ze sputa
Česká republika	505	372	307	184
Hl.m. Praha	95	82	67	41
Středočeský	49	26	33	17
Jihočeský	16	14	10	8
Plzeňský	44	33	29	13
Karlovarský	8	7	6	5
Ústecký	55	40	35	20
Liberecký	22	14	14	12
Královéhradecký	27	12	10	3
Pardubický	29	20	17	7
Vysočina	13	9	5	4
Jihomoravský	66	47	35	18
Olomoucký	21	15	14	11
Zlínský	15	12	9	3
Moravskoslezský	45	28	23	22

Za rok 2017 bylo do Registru tuberkulózy nahlášeno 505 případů onemocnění TBC (ÚZIS, 2018). Z toho bylo kultivačně pozitivních 372 případů, z nichž 307 bylo kultivačně pozitivních ze sputa a mikroskopicky jen 184 případů, taktéž ze sputa.

Nejvyšší počet hlášených onemocnění byl v Hl. městě Praha (95 případů), jako další je Jihomoravský kraj (66 případů) a Ústecký (55 případů).

Nejnižší počet hlášených onemocnění TBC byl v Karlovarském kraji, 8 případů, a v kraji Vysočina (13 případů). O dvě hlášení více má Zlínský kraj (15 případy) (ÚZIS, 2018).

**Tabulka 4** Hlášené počty TBC v krajích ČR za rok 2018 (ÚZIS, 2019)

Území kraj	TBC celkem	kultivačně pozitivní	kultivačně pozitivní ze sputa	mikroskopicky pozitivní ze sputa
Česká republika	444	355	278	144
Hl.m. Praha	96	76	61	32
Středočeský	58	52	36	17
Jihočeský	14	14	11	7
Plzeňský	34	27	23	10
Karlovarský	6	6	5	1
Ústecký	55	41	28	15
Liberecký	16	12	10	6
Královéhradecký	19	9	7	-
Pardubický	19	15	16	7
Vysočina	20	18	17	12
Jihomoravský	48	38	27	16
Olomoucký	17	16	14	6
Zlínský	5	4	4	1
Moravskoslezský	37	27	22	14

Za rok 2018 bylo nahlášenou Registru tuberkulózy o 61 případů onemocnění tuberkulózou méně, tzn. 444. Snížily se i počty u kultivací i mikroskopie. Pozitivních kultivací bylo 355, kultivací ze sputa 278, mikroskopicky pozitivních vzorků sputa bylo 144.

Nejvíce onemocnění TBC bylo opět zaznamenáno v Hl. městě Praha (96 případů), s 58 hlášeními je další kraj Středočeský a 55 hlášení onemocnění měl opět kraj Ústecký.



Nejméně nemocných bylo hlášeno v kraji Zlínském, 5 případů, a kraji Karlovarském, kde bylo evidováno 6 případů (ÚZIS, 2019).

**Tabulka 5** Hlášená onemocnění TBC u cizinců podle země narození (ÚZIS, 2018 a 2019)

Rok	Hlášená onemocnění TBC							% z celk. hláš. onem. celkem
	celkem	Ukrajina	Slovenská republika	Vietnam	Mongolsko	Rumunsko	ostatní	
2017	159	30	25	23	16	16	49	31,5
2018	147	37	24	12	9	16	49	33,1

V roce 2017 bylo nahlášeno 159 případů onemocnění tuberkulózou u cizinců. Nejvíce nemocných pochází z Ukrajiny (30 hlášení). 25 případů se vyskytlo u obyvatel narozených ve Slovenské republice a 23 případů u občanů z Vietnamu. Onemocnění TBC u cizinců tvoří 31,5 % z celkového počtu hlášených případů v Registru tuberkulózy.

V následujícím roce 2018 došlo ke snížení počtu nakažených cizinců v ČR na 147 hlášených případů. Případů u cizinců z Ukrajiny přibylo na 37, cizinci narození ve Slovenské republice mají v tomto roce o 1 hlášení méně, tedy 24. Poklesl počet nakažených Vietnamců, tím se na třetí příčku řadí Rumunsko, které zaznamenalo 16 hlášení, tedy stejně jako v předchozím roce. Celkový počet hlášení onemocnění TBC u cizinců tvoří tentokrát až 33,1 % z celkového počtu v Registru tuberkulózy (ÚZIS, 2018 a 2019).

**Tabulka 6** Hlášené počty mykobakterióz jiných než TBC (ÚZIS, 2018 a 2019)

Skupina onemocnění	Nemocní mykobakteriózou	
	2017	2018
Mykobakterióza plicní	71	88
Mykobakterióza mimoplicní	18	40
Celkem hlášená onemocnění	89	128
z toho s izolovaným:		
<i>M. avium</i>	47	67
<i>M. intracellulare</i>	9	16
<i>M. avium-intracellulare</i>	-	5
<i>M. kansasii</i>	12	13
<i>M. xenopi</i>	8	14
<i>M. jiné</i>	10	12

Za rok 2017 bylo hlášeno 89 případů mykobakteriózy, z toho 71 hlášení bylo pro plicní mykobakteriózy a 18 mimoplicních mykobakterióz. V obou případech bylo nejčastěji izolováno *M. avium* ve 47 případech, *M. kansasii* ve 12 případech a *M. intracellulare* bylo izolováno v 9 případech z celkového počtu (ÚZIS, 2018).

O rok později se zvýšil počet mykobakterióz na 128, 88 hlášení plicní mykobakteriózy a 40 mimoplicní. Nejčastěji izolované bylo *M. avium* tvořící 67 případů, *M. intracellulare* 16 izolací a *M. xenopi* ve 14 případech (ÚZIS, 2019).

**Tabulka 7** Hlášené počty zemřelých na TBC z registru TBC v krajích ČR (ÚZIS, 2018 a 2019)

Území kraj	Počet zemřelých	
	2017	2018
Česká republika	25	26
Hl.m. Praha	6	6
Středočeský	2	9
Jihočeský	1	2
Plzeňský	3	3
Karlovarský	2	-
Ústecký	3	1
Liberecký	-	-
Královéhradecký	2	-
Pardubický	2	1
Vysočina	1	-
Jihomoravský	1	3
Olomoucký	-	-
Zlínský	1	-
Moravskoslezský	1	1

Za rok 2017 v České republice zemřelo na tuberkulózu 25 osob, nejvíce v Hl. městě Praha (ÚZIS, 2018).

V roce 2018 se počet zemřelých zvýšil na 26 a nejvíce osob zemřelo ve Středočeském kraji (ÚZIS, 2019).

## 7 ZÁVĚR

Tuberkulóza je stále závažným infekčním onemocněním. Česká republika patří mezi země s nízkým výskytem tuberkulózy. Velkým problémem je výskyt onemocnění v rozvojových zemích, nebo v zemích s nižší životní úrovní. Ke zvýšení případů výskytu tuberkulózy v ČR by mohla přispět světová migrace ze zemí se zvýšeným výskytem onemocnění. Proto je důležité věnovat se prevenci, aby výskyt tuberkulózy nenarůstal, ale naopak se snižoval. Dříve byly možnosti prevence omezené pouze na tuberkulinový kožní test. V současné době je díky moderním metodám zjištění latentní tuberkulózní infekce snazší.

V práci se věnuji zejména laboratorní diagnostice. Techniky PCR sice odhalí přítomnost mykobakterií, ale detekují i mrtvé bakterie, což může vést ke zkreslení výsledků. Proto první místo zaujímá metoda kultivace na tuhých a v tekutých půdách. Rychlost diagnostiky aktivního onemocnění tuberkulózou je velmi důležitá z důvodu rychlého zabránění dalšího přenosu onemocnění. Klasická kultivace je velmi zdlouhavá, ale je nejlepším potvrzením pozitivního výsledku. Mikroskopické vyšetření nemusí vždy prokázat přítomnost acido rezistentních tyčinek ve vzorku.

Dle mého názoru je klasická kultivace nejlepším ověřením přítomnosti živých bakterií. K detekci latentního onemocnění nyní slouží hlavně IGRA testy. V budoucnu se dá očekávat další rozvoj a pokrok vývoji vyšetřovacích metod.

Velmi důležitou problematikou je také rezistence vůči léčivům. Předpokladem úspěšné léčby nemocného je rychlá diagnostika. Při zjištění přítomnosti mykobakterií u pacienta je nutné zjistit citlivost daného kmene k antituberkulotikům. Rezistence může zkomplikovat léčbu.

Výskyt tuberkulózy v České republice je velmi nízký i oproti jiným evropským zemím. Ve statistice uvedené v tabulkách je i za takto krátký časový úsek vidět pokles hlášených případů. Ve světě je však stále velká incidence TBC i úmrtnost.

V budoucnu je cílem vymýcení tuberkulózy a snížení úmrtnosti. Tento úkol si jako cíl do budoucna stanovila Světová zdravotnická organizace (WHO) za spolupráce s Evropským centrem pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC).

## 8 LITERÁRNÍ ZDROJE

AFSAR, Ilhan a Fatma Sule AFSAR, 2016. Evaluation of laboratory diagnosis for cutaneous tuberculosis. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* [online]. **59**(3), 274-278 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.4103/0377-4929.188132. ISSN 0377-4929. Dostupné z: <http://www.ijpmonline.org/text.asp?2016/59/3/274/1881323>

AKRAM, SM a P RAWLA, 2019. *Mycobacterium Kansasi* [online]. Southern Illinois: StatPearls Publishing [cit. 2020-01-09]. PMID: 28613656. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430906/>

AMLEROVÁ Jana, Pavel ČERMÁK, Jana SVOBODOVÁ, Vít ULMANN a Ilona ZEMANOVÁ, 2014. Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění. In: *Společnost pro lékařskou mikrobiologii* [online]. SLM [cit. 2020-04-8]. Dostupné z: [https://www.splm.cz/\\_download/0000016e-78d9-d7e2-a16e-7cffddf50000](https://www.splm.cz/_download/0000016e-78d9-d7e2-a16e-7cffddf50000)

AUBRY, Alexandra, Faiza MOUGARI, Emmanuelle CAMBAU a Florence REIBEL, 2017. *Mycobacterium marinum*. *Microbiology spectrum* [online]. **5**(2), 1-2 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0038-2016. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28387180>

BAILO, Rebeca, Apoorva BHATT a José A. AÍNSA, 2015. Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development. *Biochemical Pharmacology* [online]. Elsevier, 2015, **96**(3), 159-167 [cit. 2020-06-09]. DOI: [doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.001](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.001). ISSN 0006-2952. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295215002476?via%3Dihub>

BAÑULS, Anne-Laure, Sanou ADAMA, Thi Van Anh NGUYEN a Godreuil SYLVAIN, 2015. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2015, **64**(11) [cit. 2020-01-09]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000171>

BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA, 1996. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 558 s. ISBN 978-80-2380-297-9

CAMPBELL, Jonathon R., Dennis FALZON, Fuad MIRZAYEV, Ernesto JARAMILLO, Giovanni Battista MIGLIORI, Carole D. MITNICK, Norbert NDJEKA a Dick MENZIES, 2020. Improving Quality of Patient Data for Treatment of Multidrug- or Rifampin-Resistant Tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases* [online]. **26**(3) [cit. 2020-06-10]. DOI: 10.3201/eid2603.190997. ISSN 1080-6040. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7045826/#>

CAMPOS-GUTIÉRREZ, Silvia, María José RAMOS-REAL, Rossana ABREU, María Soledad JIMÉNEZ a MaríaLecuona LECUONA, 2019. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* in a hospital bronchoscopy unit. *American Journal of Infection Control* [online]. **47**(12), 1405–1524 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1016/j.ajic.2019.11.019. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019665531930985X?via%3Dihub>

CARDONA, PJ, M CATALÀ a C PRATS, 2020. Origin of tuberculosis in the Paleolithic predicts unprecedented population growth and female resistance. *Scientific reports* [online]. **10**(1) [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1038/s41598-019-56769-1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31913313>

CAULFIELD, Adam J. a Nancy L. WENGENACK, 2016. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases* [online]. 2016, **4**, 33-43 [cit. 2020-06-22]. DOI: 10.1016/j.jctube.2016.05.005. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405579416300080>

ČESKO. § 3 Vyhlášky č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2020 [cit. 22. 6. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2006-537#p3>

ČESKO. § 30 odst. 2 písm. b) bod 3. zákona č. 48/1997 Sb., o veřejném zdravotním pojištění a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. ©

AION CS 2010-2020 [cit. 22. 6. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-48#p30-2-b-3>

ČESKO. Část A písm. b) Nařízení vlády č. 361/2007 Sb., nařízení vlády, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2020 [cit. 27. 6. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-361#castA-b>

ČESKO. fragment #f4146010 Vyhlášky č. 299/2010 Sb., vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2020 [cit. 22. 6. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2010-299#f4146010>

ČESKO. fragment #f4321196 Vyhlášky č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2020 [cit. 2. 7. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-473#f4321196>

ČESKO. fragment #f4598701 Nařízení vlády č. 361/2007 Sb., nařízení vlády, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2020 [cit. 27. 6. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-361#f4598701>

DALEY, Charles L., SCHLOSSBERG, David, ed., 2017. Mycobacterium avium Complex Disease. *Microbiology Spectrum* [online]. 5(2) [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0045-2017. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28429679>

FAKULTNÍ NEMOCNICE HRADEC KRÁLOVÉ, 2020. Quantiferon TB a T-spot TB. *Fakultní nemocnice Hradec Králové* [online]. Hradec Králové [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/ukia/seznam-metod/quantiferon>

FOGEL, Nicole, 2015. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis* [online]. 95(5), 527-531 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1016/j.tube.2015.05.017. ISSN 14729792. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472979214206950>

FRANCO-SOTOMAYOR, Greta, Ismar A. RIVERA-OLIVERO, Margarita LEON-BENITEZ a Sandra E. URUCHIMA-CAMPOVERDE, 2020. Fast, Simple, and Cheap: the Kudoh-Ogawa Swab Method as an Alternative to the Petroff–Lowenstein-Jensen Method for Culturing of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2020, **58**(4) [cit. 2020-06-27]. DOI: DOI: 10.1128/JCM.01424-19. Dostupné z: <https://jcm.asm.org/content/58/4/e01424-19.abstract>

HABIB, Saad, Kartikeya RAJDEV, Sami PERVAIZ a Abdul HASAN SIDDIQUI, 2018. Pulmonary Cavitory Disease Secondary to Mycobacterium xenopi Complicated by Respiratory Failure. *Cureus* [online]. 2018, **10**(10), e3512 [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.7759/cureus.3512. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6318116/>

HUANG, Tsi-Shu, Chia-Chien LEE, Hui-Zin TU a Susan Shin-Jung LEE, 2018. Rapid identification of mycobacteria from positive MGIT broths of primary cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(2), e0192291 [cit. 2020-07-04]. DOI: 10.1371/journal.pone.0192291. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0192291>

HUONG, Truong Thanh, Markéta KOMÍNKOVÁ a Roman GURÁŇ, 2014. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. Brno, 2014, **1**(1), 64-66 [cit. 2020-07-04]. ISSN 2336-3940. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/J\\_Met\\_Nano/0214/pdf/d-microbial\\_identification\\_by\\_maldi-tof\\_ms.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/d-microbial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf)

CHAE, Hansong, Seung Jung HAN a Su-Young KIM, 2017. Development of a One-Step Multiplex PCR Assay for Differential Detection of Major Mycobacterium Species. *J Clin Microbiol* [online]. 2017, **55**(9), 2736–2751 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1128/JCM.00549-17. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5648710/>

JAYA CHANDRA, T., R. SELVARAJ a Y. V. SHARMA, 2015. Same day sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: Ziehl-Neelsen versus fluorescent staining. *Journal of Family Medicine and Primary Care* [online]. 2015, **4**(4), 525–528 [cit. 2020-07-04]. DOI: 10.4103/2249-4863.174273. ISSN 2249-4863. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4776603/>



JOHNSTON, James C., Leslie CHIANG a Kevin ELWOOD, 2017. Mycobacterium kansasii. *Mikrobiology spektrum* [online]. **5**(1) [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0011-2016. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185617>

KARAKEÇE, Engin, Hüseyin Agah TERZI a İhsan Hakki ÇIFTCI, 2014. Could a step in the isolation of mycobacteria from sputum samples be eliminated by new decontamination kits? *Pol J Microbiol* [online]. 2014, **63**(3), 369-371 [cit. 2020-07-16]. ISSN 2544-464. PMID: 25546950. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25546950/>

LANDE, Leah, Jason GEORGE a Theodore PLUSH, 2018. Mycobacterium avium complex pulmonary disease: new epidemiology and management concepts. *Current opinion in infectious diseases* [online]. **31**(2), 199-207 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000437. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29346118>

LANGE, Christoph, Dumitru CHESOV, Jan HEYCKENDORF, Chi C. LEUNG, Zarir UDWADIA a Keertan DHEDA, 2018. Drug-resistant tuberculosis: An update on disease burden, diagnosis and treatment. *Respirology* [online]. **23**(7), 656-673 [cit. 2020-06-10]. DOI: 10.1111/resp.13304. ISSN 13237799. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/resp.13304>

LEMPP, Jason M., Margan J. ZAJDOWICZ, Arlene L. HANKINSON a Sean R. TONEY, 2017. Assessment of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test for the detection of Mycobacterium tuberculosis infection in United States Navy recruits. *PLoS One* [online]. 2017, **12**(5), e0177752 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1371/journal.pone.0177752. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5435309/>

LIM, Jae-Hyung, Chang-Ki KIM a Mi Hyun BAE, 2019. Evaluation of the performance of two real-time PCR assays for detecting Mycobacterium species. *J Clin Lab Anal* [online]. 2019, **33**(1), e22645 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1002/jcla.22645. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6430364/>

LYON, Sarah M. a Milton D. ROSSMAN, 2017. Pulmonary Tuberculosis. *Microbiology Spectrum* [online]. **5**(1) [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016. ISSN 2165-0497. Dostupné z:

<http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016>

MARTÍN ASENJO, Miguel, Javier Miguel MARTÍN GUERRA, María Rosa LÓPEZ PEDREIRA a José María PRIETO DE PAULA, 2017. Mycobacterium xenopi and Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Scientific Letter* [online]. **53**(12), 698-700 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1016/j.arbres.2017.05.009. Dostupné z: <https://www.archbronconeumol.org/en-mycobacterium-xenopi-squamous-cell-carcinoma-articulo-S1579212917303452>

MARTINEZ, Leonardo, Limei ZHU, Maria E. CASTELLANOS a Qiao LIU, 2017. Glycemic Control and the Prevalence of Tuberculosis Infection: A Population-based Observational Study. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2017, **65**(12), 2060–2068 [cit. 2020-07-05]. DOI: doi.org/10.1093/cid/cix632. ISSN 1537-6591. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/65/12/2060/4558630>

MENG-RUI, Lee, WH SHENG, CC HUNG a CJ YU, 2015. Mycobacterium abscessus Complex Infections in Humans. *Emerging infectious diseases* [online]. **21**(9), 1638-1646 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.3201/2109.141634.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4550155/>

MUDDAIAH, Ravish Kumar, Pratibha Malini JAMES a Ravikumar Kadahalli LINGEGOWDA, 2013. Comparative study of Smear Microscopy, Rapid Slide Culture, and Lowenstein - Jensen culture in cases of pulmonary tuberculosis in a tertiary care hospital. *Journal of research in medical sciences* [online]. 2013, **18**(9), 767-771 [cit. 2020-04-07]. PMID: 24381619. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3872584/>

NIGUSE, Selam, Kassu DESTA a Gebremdihin GEBREMICHAEL, 2018. QuantiFERON-TB Gold In-tube test for the diagnosis of active and latent tuberculosis in selected health facilities of Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Res Notes* [online]. 2018, **11**(1), 293 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1186/s13104-018-3410-x. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5948922/>

PAI, Madhukar a Marcel BEHR, 2017. Latent Mycobacterium tuberculosis Infection and Interferon-Gamma Release Assays. JACOBS JR., William R., Helen MCSHANE, Valerie MIZRAHI a Ian M. ORME, ed. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus* [online]. 2nd Edition. ASM Press, s. 379-388 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1128/9781555819569.ch17. ISBN 9781683670834. Dostupné z:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555819569.ch17>

PATIL, Naveen, Asween MARCO, Maria Theresa MONTALES a Nutan BHASKAR, 2015. Pulmonary Tuberculosis in a Patient with Cystic Fibrosis. *N Am J Med Sci.* [online]. 2015, 7(5), 233–235 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.4103/1947-2714.157494. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462821/>

SEAWORTH, Barbara J. a David E. GRIFFITH, 2017. Therapy of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. GRIFFITH, David E. *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections* [online]. Seventh Edition. American Society for Microbiology, s. 129-158 [cit. 2020-06-10]. ISBN 9781683670605. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555819866.ch9>

SHAH, Ira, Vishrutha POOJARI a Himali MESHARAM, 2020. Multi-Drug Resistant and Extensively-Drug Resistant Tuberculosis. *The Indian Journal of Pediatrics* [online]. 2020, 87(2) [cit. 2020-06-10]. DOI: [doi.org/10.1007/s12098-020-03230-1](https://doi.org/10.1007/s12098-020-03230-1). ISSN 0973-7693. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12098-020-03230-1>

SINGHAL, Ritu a Vithal Prasad MYNEEDU, 2015. Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *International Journal of Mycobacteriology* [online]. Elsevier, 2015, 4(1), 1-6 [cit. 2020-07-02]. DOI: [doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.12.006](https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.12.006). Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212553115000461>

SRISUWANVILAI, La-ong, Patama MONKONGDEE, Laura Jean PODEWILS a Keerataya NGAMLERT, 2008. Performance of the BACTEC MGIT 960 compared with solid media for detection of Mycobacterium in Bangkok, Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 2008, 61(4), 402-407 [cit. 2020-06-27]. DOI:

doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.015.

Dostupné

z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889308001521>

TORTOLI, Enrico, 2019. The Taxonomy of the Genus Mycobacterium. VELAYATI, Ali Akbar a Parissa FARNIA. *Nontuberculous Mycobacteria (NTM): Microbiological, Clinical and Geographical Distribution* [online]. Elsevier, s. 1-10 [cit. 2020-06-7]. ISBN 978-0-12-814692-7.

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128146927000012>

ÚZIS, 2019. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2018. In: *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. Praha: ÚZIS, 2019 [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008271/tbc2018-cz-a2b.pdf>

ÚZIS, 2018. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2017. In: *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. Praha: ÚZIS, 2018 [cit. 2020-04-28]. Dostupné z:

[https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/tbc2017\\_cz.pdf](https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/tbc2017_cz.pdf)

VAN CREVEL, R., 2017. Tuberculosis. POWDERLY, William G., Jonathan COHEN a Steven M. OPAL, ed. *Infectious diseases* [online]. 4 th. Elsevier, s. 271–284 [cit. 2020-06-6]. ISBN 978-0-7020-6285-8. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702062858000319>

VAN INGEN, Jakko, 2017. Mycobacteria. POWDERLY, William G., Jonathan COHEN a Steven M. OPAL, ed. *Infectious diseases* [online]. 4 th. Elsevier, s. 1645-1659 [cit. 2020-06-6]. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00185-4. ISBN 978-0-7020-6285-8. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702062858001854>

VAN INGEN, Jakko, 2017. Nontuberculous Mycobacterial Diseases. POWDERLY, William G., Jonathan COHEN a Steven M. OPAL, ed. *Infectious Diseases* [online]. 4 th. Elsevier, s. 285-291 [cit. 2020-06-6]. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00032-0. ISBN 978-0-7020-6285-8.

Dostupné

z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702062858000320>

VAŠÁKOVÁ, M., 2017. Současný přístup k diagnostice, léčbě a prevenci tuberkulózy. *Vnitř Lék* [online]. Olomouc: Solen, 2017, **63**(11), 815-820 [cit. 2020-06-21]. ISSN 1801-7592. Dostupné z: <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2017/11/10.pdf>

VOTAVA, Miroslav, 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 80-902896-6-5

WALLENFELS, Jiří, Martina VAŠÁKOVÁ a Ivan SOLOVIČ, 2018. Aktuální farmakoterapie tuberkulózy. *KLINICKÁ FARMAKOLOGIE A FARMACIE* [online]. 2018, **32**(4), 10-14 [cit. 2020-06-10]. DOI: 10.36290/far.2018.032. Dostupné z: <https://klinickafarmakologie.cz/savepdfs/far/2018/04/02.pdf>

## 9 ZDROJE OBRÁZKŮ A TABULEK

AUBRY, Alexandra. *Researchgate* [online]. 2017 [cit. 6.4.2020]. Typical photochromogenic colonies of Mycobacterium marinum grown on Lowenstein-Jensen solid medium Dostupný na WWW: [https://www.researchgate.net/figure/Typical-photochromogenic-colonies-of-Mycobacterium-marinum-grown-on-Lowenstein-Jensen\\_fig1\\_315963991](https://www.researchgate.net/figure/Typical-photochromogenic-colonies-of-Mycobacterium-marinum-grown-on-Lowenstein-Jensen_fig1_315963991)

BAILO, Rebeca, Apoorva BHATT a José A. AÍNSA, 2015. Drugs used in the treatment of tuberculosis. Lipid transport in Mycobacterium tuberculosis and its implications in virulence and drug development. *Biochemical Pharmacology* [online]. Elsevier, 2015, **96**(3), 159-167 [cit. 2020-06-09]. DOI: doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.001. ISSN 0006-2952. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295215002476?via%3Dihub>

CARR, Janice. *Wikiskripta* [online]. 1.1.2006 [cit. 6.6.2020]. Dostupný na WWW: [https://www.wikiskripta.eu/w/Mycobacterium\\_tuberculosis#/media/File:Mycobacterium\\_tuberculosis.jpg](https://www.wikiskripta.eu/w/Mycobacterium_tuberculosis#/media/File:Mycobacterium_tuberculosis.jpg)

CAULFIELD, Adam J. a Nancy L. WENGENACK, 2016. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and*

*Other Mycobacterial Diseases* [online]. Acid-fast bacilli stains fluorescent auramin-rhodamin stain 2016, **4**, 33-43 [cit. 2020-06-22]. DOI: 10.1016/j.jctube.2016.05.005. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405579416300080>

GAIAO, Maria José. *Flickr* [online]. 2015 [cit. 6.4.2020]. Mycobacterium tuberculosis Ziehl-Neelsen de kultura pura Dostupný na WWW:

<https://www.flickr.com/photos/136855048@N02/22646933550/in/photolist-Avesky-5V2RyF-wzuG3-nTpfYq-6mGmAn-cKQDAC-4DJNpj-37BULT-hjgZcz-6mLw5d-cwbCU3-6mGmgi-rErNRx-hg8uVj-9kLKvJ-4xNPn8-814VbD-815a3c-ar22qp-o9gv3E-dt5m9J-CPWd5H-9zTPEM-nUx4Tb-DMpgJD-93BsDA-Rz8Czc-3fECfP-Mt79V-8R31Ps-8R31PQ-E822Y-2iLYt87-9TtEgv-2iFuWJs-rwX3PF-KdvAq5-bm3FL7-bm3BNj-818XFN-GJdrGh-byWUGH-dPRzbR-byXsv4-9rjXyU-81qYWq-5uH45C-7As6Bx-8Bz9Dv-aKXGoK>

KUBICA, George. *Flickr* [online]. 2011 Mycobacterium tuberculosis culture [cit. 6.4.2020].

Dostupný na WWW: <https://www.flickr.com/photos/microbeworld/5726843234/in/photolist-9J4yYs-Avesky-nTpfYq-4DJNpj-rErNRx-CPWd5H-9zTPEM-5V2RyF-wzuG3-6mGmAn-cKQDAC-37BULT-hjgZcz-6mLw5d-cwbCU3-6mGmgi-hg8uVj-9kLKvJ-4xNPn8-814VbD-815a3c-ar22qp-o9gv3E-dt5m9J-nUx4Tb-DMpgJD-93BsDA-Rz8Czc-3fECfP-Mt79V-8R31Ps-8R31PQ-E822Y-2iLYt87-9TtEgv-2iFuWJs-rwX3PF-KdvAq5-bm3FL7-bm3BNj-818XFN-GJdrGh-byWUGH-dPRzbR-byXsv4-9rjXyU-81qYWq-5uH45C-7As6Bx-8Bz9Dv>

READING, Nathan. *Flickr* [online]. 2010 [cit. 6.4.2020]. Mycobacterium kansasii growing on LJ medium Dostupný na: <https://www.flickr.com/photos/54976525@N08/5833392195>

ÚZIS, 2018. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2017. In: *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. Praha: ÚZIS, 2018 [cit. 2020-04-28]. Dostupné z:

[https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/tbc2017\\_cz.pdf](https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/tbc2017_cz.pdf)

ÚZIS, 2019. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2018. In: *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. Praha: ÚZIS, 2019 [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008271/tbc2018-cz-a2b.pdf>

VAN CREVEL, R., 2017. Tuberculosis. POWDERLY, William G., Jonathan COHEN a Steven M. OPAL, ed. *Infectious diseases* [online]. Mycobacterium fortuitum, nonchromogenic rapid grower, grown on Middlebrook 7H10 agar 4 th. Elsevier, s. 271–284 [cit. 2020-06-6]. ISBN 978-0-7020-6285-8. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702062858000319>

VAN INGEN, Jakko, 2017. Mycobacteria. POWDERLY, William G., Jonathan COHEN a Steven M. OPAL, ed. *Infectious diseases* [online]. M. avium grown on Middlebrook 7H10 agar. The two most frequent morphologies are shown (beige opaque colonies and smaller translucent colonies). 4 th. Elsevier, s. 1645-1659 [cit. 2020-06-6]. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00185-4. ISBN 978-0-7020-6285-8. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702062858001854>

VAN INGEN, Jakko, 2017. Mycobacteria. POWDERLY, William G., Jonathan COHEN a Steven M. OPAL, ed. *Infectious diseases* [online]. Mycobacterial cell envelope. 4 th. Elsevier, s. 1645-1659 [cit. 5.7.2020]. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00185-4. ISBN 978-0-7020-6285-8. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702062858001854>