

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Botagoz Anapina

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Současné metody detekce a léčby tuberkulózy. Porovnání situace v ČR
a Kazachstánu

Bakalářská práce

2024

Botagoz Anapina

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Botagoz Anapina**
Osobní číslo: **C21381**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Současné metody detekce a léčby tuberkulózy. Porovnání situace v ČR a Kazachstánu**
Téma práce anglicky: **Current Methods of Detection and Treatment of Tuberculosis. Comparison of the Situation in the Czech Republic and Kazakhstan.**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši popisující metody detekce a terapie tuberkulózy.
- 2) Věnujte se epidemiologii tuberkulózy, seznamte se s možnostmi vakcinace i prevence.
- 3) Porovnejte epidemiologická data, diagnostiku, terapii a prevenci onemocnění v ČR a Kazachstánu.
- 4) Literární zdroje čerpejte zejména z databází WOS a Medline, Státního zdravotního ústavu a WHO i národního registru v Kazachstánu.
- 5) Bakalářskou práci zpracujte dle směrnice Univerzity Pardubice upravující formální zpracování závěrečných prací.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Současné metody detekce a léčby tuberkulózy. Porovnání situace v ČR a Kazachstánu 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 26. 6. 2024

Botagoz Anapina v.r.

ANOTACE

Bakalářská práce se zaměřuje na porovnání tradičních a moderních metod detekce tuberkulózy v posledních deseti letech. V úvodu je stručně popsána historie tohoto onemocnění a charakteristika bakterie, která jej způsobuje. Následně se práce věnuje možnostem léčby a prevenci tuberkulózy. Podrobně jsou popsány jednotlivé diagnostické metody a jejich účinnost v boji proti této nemoci. Práce také zahrnuje srovnání výskytu tuberkulózy a situace s očkováním v Kazachstánu a České republice.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mycobacterium tuberculosis, léčba, prevence, moderní metody diagnostiky

TITLE

Current Methods of Detection and Treatment of Tuberculosis. Comparison of the Situation in the Czech Republic and Kazakhstan

ANNOTATION

The bachelor thesis focuses on comparing traditional and modern methods of tuberculosis detection over the last ten years. The introduction briefly describes the history of the disease and the characteristics of the bacterium that causes it. Subsequently, the thesis explores the options for tuberculosis treatment and prevention. Various diagnostic methods and their effectiveness in combating the disease are detailed. The work also includes a comparison of the incidence of tuberculosis and the vaccination situation in Kazakhstan and the Czech Republic.

KEYWORDS

Mycobacterium tuberculosis, treatment, prevention, modern methods of diagnosis

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK	8
Grafy.....	8
Obrázky	8
Tabulky	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
ÚVOD.....	11
1 Historie tuberkulózy a její výskyt v současné době	12
1.1 Historie tuberkulózy.....	12
1.2 Výskyt v současné době.....	13
1.2.1 Srovnání výskytu v České republice a Kazachstánu.....	14
1.2.2 Epidemiologická situace v Evropě během války na Ukrajině	15
2 Charakteristika tuberkulózních bakterií.....	18
2.1 Patogeneze tuberkulózy	20
2.2 Typy tuberkulózních infekcí.....	23
3 Léčba a prevence	29
3.1 Léčba	29
3.2 Prevence	31
3.2.1 Vakcinace proti TBC.....	31
3.2.1.1 Vakcinace v České republice a Kazachstánu.....	32
4 Tradiční metody detekce tuberkulózních bakterií a jejich modifikace.....	33
4.1 Kultivace	33
4.2 Mikroskopie.....	34
5 Moderní metody detekce tuberkulózních bakterií za poslední 10 let	37
5.1 Molekulární testy	37
5.1.1 Test amplifikace nukleových kyselin (NAAT).....	37
5.1.1.1 GenoType Line Probe Assays (LPA).....	37
5.1.1.2 GeneXpert MTB/RIF	38
5.1.1.3 Technologie izotermického zesílení zprostředkovaného smyčkou (LAMP) ...	39
5.1.1.4 Seegene Anyplex MTB/NTM.....	40
5.1.1.5 Sekvenování celého genomu (WGS)	40
5.2 Imunologické testy.....	42
5.2.1 Test lipoarabinomannanu v moči (TB-LAM)	42
5.2.2 Test uvolňování interferonu-gama (IGRA)	42
6 Porovnání tradičních a moderních metod	44
Závěr.....	47
POUŽITÁ LITERATURA	48

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Grafy

Graf 1: Počet nově diagnostikovaných případů tuberkulózy od roku 2010 do roku 2022 (Global Tuberculosis Report 2023)	14
Graf 2: Počet případů TBC na Ukrajině v letech 2018-2022 (Wilczek et al., 2023)	16
Graf 3: Počet případů tuberkulózy v ČR v kategoriích občanů ČR a cizinců, včetně narozených na Ukrajině, 2018-2022 (Wilczek et al., 2023).....	17

Obrázky

Obrázek 1: Interakce ATB s bakterií (Kia et al., 2023).....	18
Obrázek 2: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CDC, 2006).....	19
Obrázek 3: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> na agaru (Shain, 2017).....	20
Obrázek 4: Infekce bakteriemi (Rahlwes et al., 2023)	21
Obrázek 5: BCG vakcinace a imunitní odpověď (Li et al, 2021)	32
Obrázek 6: Mikrofotografie nátěru ze sputa zbarveného ZN ukazující tuberkulózní bacily (1000x) jako jasně růžové až červené, koráلكové nebo pruhované formy, zatímco buňky tkání jsou zbarveny modře (Acharya a Vyas,2018).....	36
Obrázek 7: Mikrofotografie nátěru sputa obarveného fluorescenčním barvivem pomocí LED mikroskopie (400x), kde bacily září žlutě na tmavém pozadí (Acharya a Vyas,2018)	36

Tabulky

Tabulka 1: Rozdíl mezi latentní a aktivní tuberkulózou (Kia et al., 2023)	21
Tabulka 2: Druhy mimoplicní tuberkulóza (Ramirez-Lapausa et al., 2015).....	24
Tabulka 3: Léčba tuberkulózy antibiotiky (Suárez et al., 2019).....	29
Tabulka 4: Postup léčby pro MDR-TB (Seung, 2015).....	30
Tabulka 5: Tradiční a moderní metody detekce.....	44

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIDS	Syndrom získaného imunodeficitu
AFB	Acidorezistentní bakterie
ARDS	Syndrom akutní respirační tísně
ATB	Antibiotika
BCG	Vakcína Bacillus Calmette-Guerin
CDC	Centra pro kontrolu a prevenci nemocí
CNS	Centrální nervová soustava
CT	Počítačová tomografie
ECDC	Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí
EMB	Ethambutol
EPT	Mimoplicní tuberkulóza
FM	Fluorescenční mikroskopie
FNAB	Aspirační biopsie tenkou jehlou
HIV	Virus lidské imunodeficiency
IGRA	Test uvolňování interferonu gama
INH	Isoniazid
LAMP	Technologie izotermického zesílení zprostředkovaného smyčkou
LPA	Line Probe Assays
MDR-TB	Multirezistentní tuberkulóza
MRI	Zobrazování magnetickou rezonancí
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAAT	Test amplifikace nukleových kyselin
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PZA	Pyrazinamid
QFT-GIT Test	QuantiFERON-TB Gold In-Tube
QFT-Plus Test	QuantiFERON-TB Gold Plus
RIF	Rifampicin
SSM	Mikroskopie výtěru ze sputa
TB-LAM	Test lipoarabinomannanu v moči
TBC	Tuberkulóza
WHO	Světová Zdravotnická Organizace
WGS	Sekvenování celého genomu

XDR-TB

Extenzivně lékově rezistentní tuberkulóza

ZN

Ziehl-Neelsenovo barvení

ÚVOD

Tuberkulóza, kterou způsobuje bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, byla v roce 2022 po koronavirovém onemocnění (COVID-19) druhou nejčastější příčinou úmrtí. Nemoc způsobila zhruba dvakrát více úmrtí než HIV/AIDS a každoročně se stále nakazí více než 10 milionů lidí.

Tuberkulóza zůstává jednou z nejnebezpečnějších nemocí na světě. Může postihnout jakýkoli lidský orgán nebo infikovat orgánové systémy. Původce tuberkulózy, Kochův bacil, je vysoce nakažlivý (infekční) a mimořádně odolný vůči vlivům prostředí.

Imunitní systém zdravého člověka aktivně bojuje s tuberkulózou, ale pokud se oslabí, může nemoc přejít do aktivní formy. V posledních desetiletích bylo vyvinuto mnoho metod, které umožňují včasné odhalení této nemoci, což je klíčové pro její účinnou léčbu a prevenci šíření.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na srovnání tradičních a moderních metod detekce tuberkulózy. Moderní metody významně usnadnily diagnostický proces díky své rychlosti a jednoduchosti. Některé z těchto metod nevyžadují odborné vzdělání, což umožňuje širší dostupnost a použití i v méně rozvinutých oblastech. Práce dále zkoumá účinnost těchto metod a jejich přínos v boji proti tuberkulóze.

1 Historie tuberkulózy a její výskyt v současné době

1.1 Historie tuberkulózy

Studie vzorků kostí odebraných z neolitického lidského sídliště ve východním Středomoří poskytují nejpřesvědčivější důkaz, že *M. tuberculosis* a lidé koexistovali po velmi dlouhou dobu (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2024). Předpokládá se, že rod *Mycobacterium* vznikl asi před 150 miliony let (Barberis *et al.*, 2017). Díky nízké míře mutací *M. tuberculosis* a moderním technikám molekulární genetiky a sekvenování genomu je možné přesněji určit dobu vzniku mykobakterií. Poté, co Gutierrez a její kolegové zjistili, že raný předek *M. tuberculosis* existoval ve východní Africe již před 3 miliony let, vyslovili hypotézu, že se jím v té době mohli infikovat první hominidé. Všichni současní členové komplexu *Mycobacterium tuberculosis* však s největší pravděpodobností měli společného afrického předka před 35 000 až 15 000 lety. Patří sem nejen *M. tuberculosis*, ale také jeho africké varianty, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii* a *Mycobacterium bovis* (Thomas 2006).

Po celý středověk a až do průmyslové éry byla tuberkulóza v lékařské literatuře označována jako ftiza, “bílý mor” nebo souchotiny. Všechny tyto termíny odkazovaly na nezastavitelný postup nemoci, která postupně oslabovala tělo oběti (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2024). Termín “tuberkulóza” poprvé použil Sylvius v roce 1650. Pochází ze slova “tubercle”, což označuje histologickou lézi, která se objevuje v orgánech postižených touto nemocí (Riccardi *et al.*, 2020). Francis Sylvius ve svém díle Opera Medica z roku 1679 podal přesný klinický a anatomický popis této nemoci. Popsal tuberkulózy a jejich vývoj do abscesů, dutin a empyémů v plicích a na dalších místech u pacientů. První oficiální zmínka o nakažlivosti nemoci se objevuje krátce poté v italském zdravotnickém právu, konkrétně v ediktu vydaném Republikou Lucca v roce 1699, kde pak v roce 1735 Zdravotní rada této republiky nařídila povinné hlášení a izolaci nemocných, zakázala jejich přijetí do veřejných nemocnic a zřídila speciální místa pro jejich léčbu (Barberis *et al.*, 2017).

Prvním, kdo zavedl termín “tuberkulóza” do lékařské literatury, byl Johann Lukas Schönlein v polovině 19. století. V roce 1867 byl Theodor Albrecht Edwin Klebs jedním z prvních vědců, kteří se pokusili izolovat bakterie. Nicméně izolovat a identifikovat

tuberkulózní bacil se podařilo až v roce 1882 německému lékaři Robertu Kochovi, který pak 24. března představil svůj objev *Mycobacterium tuberculosis* před Fyziologickou společností v Berlíně (Barberis *et al.*, 2017). Od té doby je 24. březen každoročně uznáván jako "Světový den tuberkulózy" (Kia *et al.*, 2023). V průběhu následujících desetiletí po tomto objevu byly vytvořeny Pirquetův a Mantouxův tuberkulinové kožní test, vakcína BCG od Alberta Calmetta a Camilla Guérina, streptomycin od Selmana Waksmana a další protituberkulózní léky. Rovněž Koch za svůj vědecký přínos, který pomohl objasnit infekční etiologii tuberkulózy, obdržel v roce 1905 Nobelovu cenu (Barberis *et al.*, 2017).

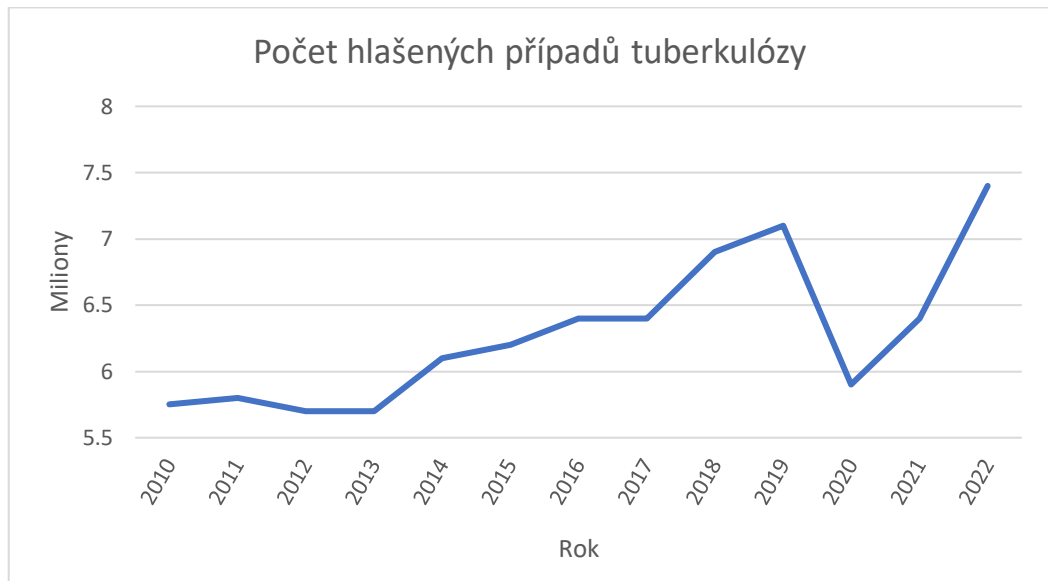
1.2 Výskyt v současné době

Jen málo nemocí ovlivnilo dějiny lidstva tolik jako tuberkulóza. Lidská onemocnění způsobuje *Mycobacterium tuberculosis* již více než 4 000 let. Od vědeckého objevu tuberkulózy v roce 1882 na ni zemřela více než miliarda lidí. To je vyšší počet úmrtí než u malárie, neštovic, HIV/AIDS, cholery, moru a chřipky dohromady (Kim a Swaminathan, 2021).

M. tuberculosis se vyskytuje asi u 25 % světové populace (latentně), ačkoli pouze asi 10 % lidí někdy onemocní tuberkulózou. Riziko je výrazně vyšší u osob s oslabenou imunitou (např. HIV pozitivních osob) (ECDC, 2023). Přibližně 90 % případů tuberkulózy se vyskytuje u dospělých, s vyšším výskytem u mužů než u žen. Úmrtnost spojená s tuberkulózou je vysoká, dosahující přibližně 50 %. Současná léčba doporučená WHO dosahuje úspěšného vyléčení u přibližně 85 % pacientů s tuberkulózou. Tato léčba zahrnuje podávání léků proti tuberkulóze po dobu čtyř až šesti měsíců. Existují různé možnosti léčby tuberkulózní infekce, které se liší v délce trvání, od jednoho do šesti měsíců. Kromě toho je také důležité přijmout komplexní opatření zaměřená na řešení faktorů, které mohou vest k rozšíření tuberkulózy, například chudoba, nedostatečná výživa, infekce HIV, kouření a cukrovka. Tím se dá snížit počet nových případů a úmrtí způsobených TBC (Global Tuberculosis Report 2023).

V roce 2022 bylo po celém světě zaznamenáno nových 7,5 milionu případů tuberkulózy. Toto číslo, přesahující původní hodnotu před začátkem pandemie v roce 2019 (7,1 milionu), představuje nejvyšší úroveň od roku 1995, kdy Světová zdravotnická organizace začala sledovat tuberkulózu globálně. V roce 2020 bylo zaznamenáno 5,8 milionu případů a v roce 2021 6,4 milionu (viz graf č. 1) (Global Tuberculosis Report 2023).

*Graf 1: Počet nově diagnostikovaných případů tuberkulózy od roku 2010 do roku 2022
(Global Tuberculosis Report 2023)*



1.2.1 Srovnání výskytu v České republice a Kazachstánu

V roce 2022 bylo v České republice hlášeno celkem 383 případů tuberkulózy, což představuje 3,56 případů na 100 000 obyvatel. Tato čísla zaznamenala nárůst oproti předchozímu roku o 26 případů. Lze konstatovat, že i přes nárůst počtu hlášených případů tuberkulózy v roce 2022, Česká republika patří mezi země s nízkým výskytem tuberkulózy a disponuje účinným systémem dohledu a reakce na tuto infekční chorobu (ÚZIS ČR 2024). Na druhé straně v Kazachstánu došlo k významnému poklesu incidence TBC z 81,7 na 36,5 případů na 100 000 obyvatel v roce 2022. Stejně tak se snížila prevalence z 69,2 na 49,6 případů, což svědčí o úspěšnosti opatření a programů zaměřených na kontrolu této nemoci (Ministerstvo zdravotnictví Republiky Kazachstán, 2023).

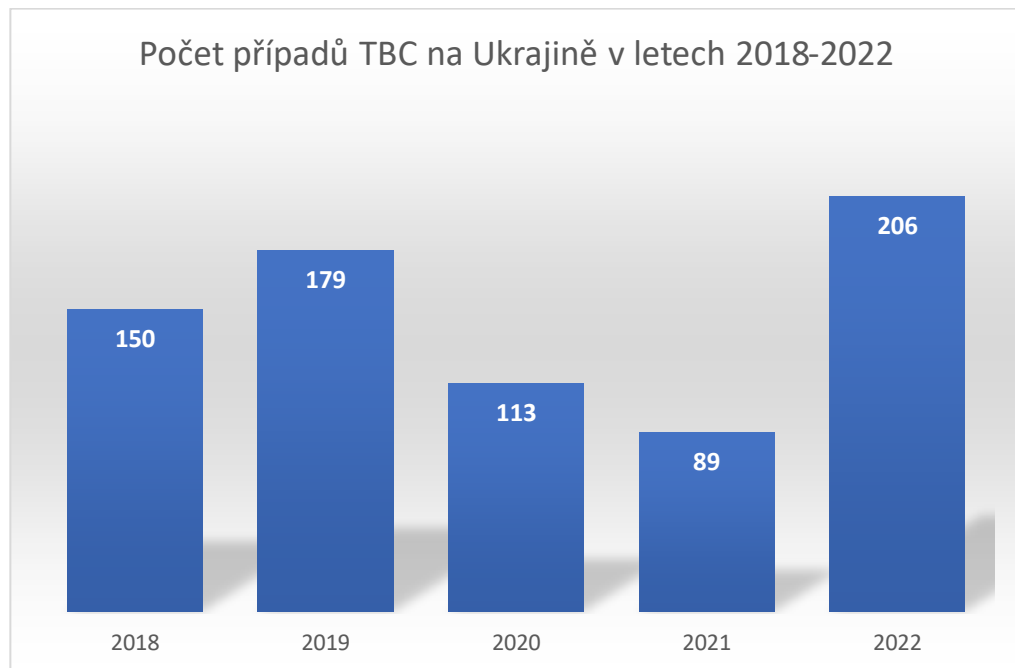
1.2.2 Epidemiologická situace v Evropě během války na Ukrajině

Podle zprávy WHO Ukrajina je na čtvrtém místě v Evropě s výskytem TBC. Kromě toho je na patém místě po celém světě v počtu registrovaných případů tuberkulózy rezistentních na léky (Wilczek, Natalia Anna et al., 2023). Předpokládaná incidence TBC v roce 2021 byla na Ukrajině 73 případů na 100 000 obyvatel, zatímco v EU byla incidence 9,5 případů na 100 000 obyvatel. I přestože ECDC a pokyny WHO nedoporučují plošné testování migrantů a uprchlíků na tuberkulózu (Dohál *et al.*, 2024).

V roce 2022 byla válka s Ruskem hlavní příčinou masové migrace velké množství občanů do sousedních zemí EU. K 7. únoru 2023 bylo v Evropě registrováno více než 8 milionů ukrajinských uprchlíků - nejvyšší počet od druhé světové války. Tato situace přispěla k vzniku dalších epidemiologických problémů. Státy s největším přílivem uprchlíků byly Slovensko, Polsko, ČR a Rumunsko (Dohál *et al.*, 2024).

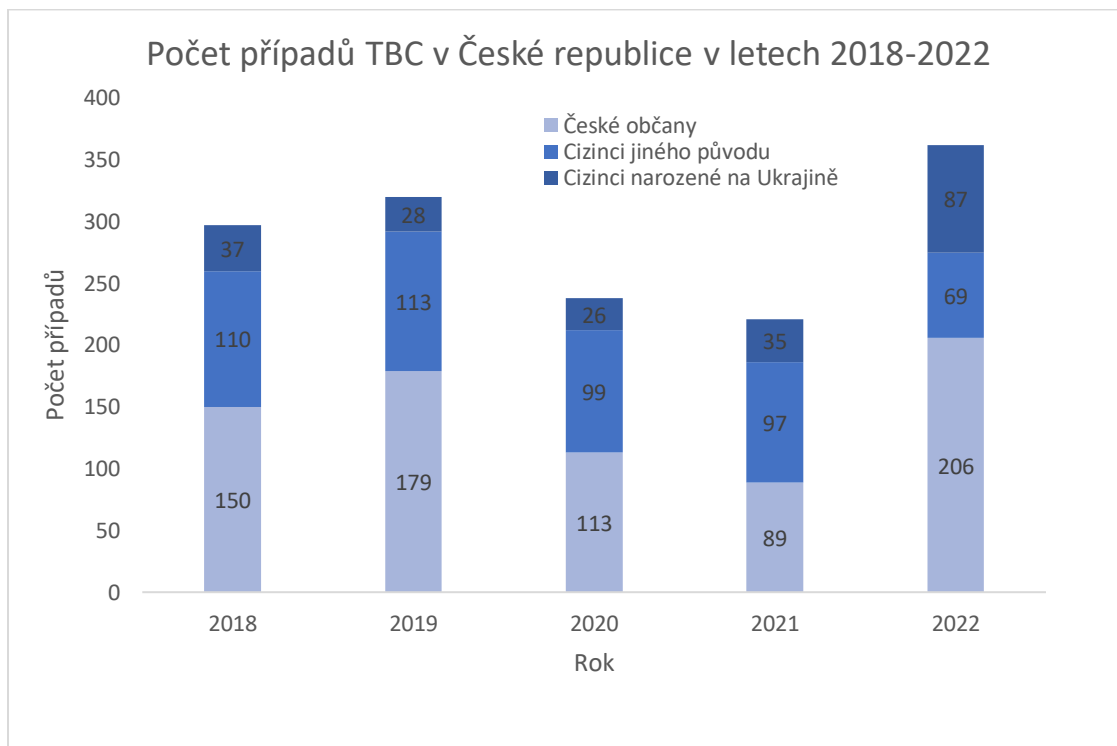
Ukrajina vykazovala významný pokles v boji proti tuberkulóze do začátku války. Mezi lety 2018 a 2020 došlo k výraznému snížení počtu nakažených na téměř 13 tisíc osob. Rok 2020 zaznamenal nejnižší počet nahlášených případů, pravděpodobně kvůli omezené dostupnosti zdravotnické péče způsobené pandemií COVID-19. V následujících dvou letech došlo k nárůstu počtu hlášených případů tuberkulózy. Podle ukrajinského Centra veřejného zdraví bylo v roce 2022 v zemi zaznamenáno 18 510 případů (viz graf č. 2) (Wilczek *et al.*, 2023).

Graf 2: Počet případů TBC na Ukrajině v letech 2018-2022 (Wilczek et al., 2023)



Stejně jako v Polsku a Německu, i v České republice došlo v letech 2018 až 2022 k nárůstu případů tuberkulózy u cizinců. Nejvyšší počet nahlášených případů byl zaznamenán v roce 2022, což je jistě způsobeno rostoucí přítomností velkého počtu uprchlíků (viz graf č. 3) (Wilczek et al., 2023).

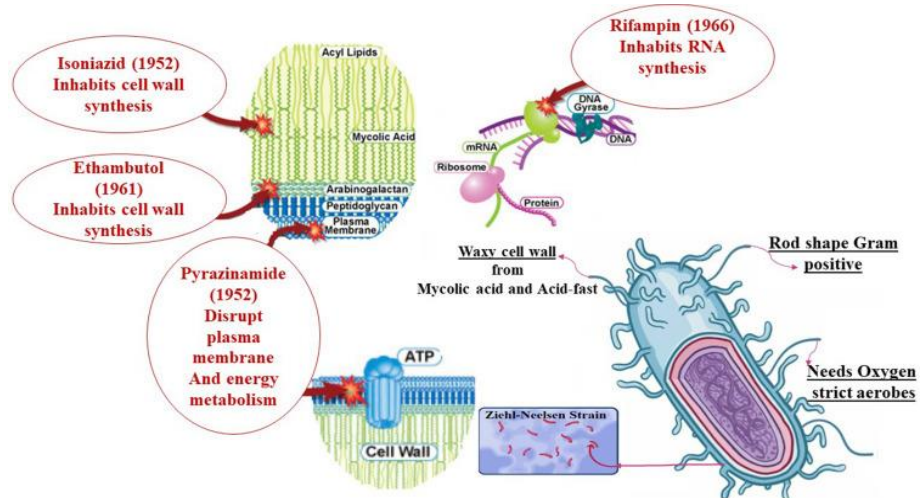
Graf 3: Počet případů tuberkulózy v ČR v kategoriích občanů ČR a cizinců, včetně narozených na Ukrajině, 2018-2022 (Wilczek et al., 2023)



2 Charakteristika tuberkulózních bakterií

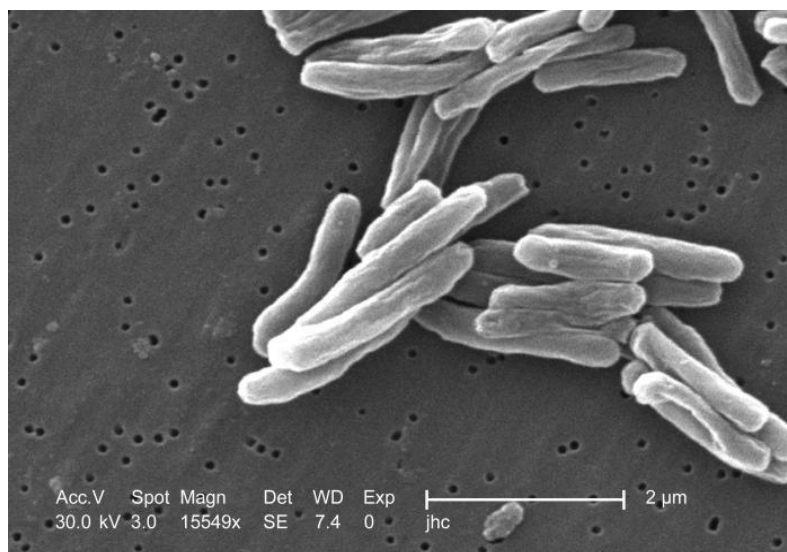
Mycobacterium tuberculosis je bakterie, která primárně infikuje plíce a způsobuje tuberkulózu. Kromě toho může onemocnění známé jako mimoplicní tuberkulóza poškodit jakýkoli jiný orgán nebo tkáň, včetně mozku, ledvin, páteře, mízních uzlin a ledvin (Rahlwes *et al.*, 2023). Bakterie jsou aerobní, pomalu rostoucí, tyčinkovité, štíhlé a volně žijící v půdě a vodě a mikroorganismy nevytvářející spory (Kia *et al.*, 2023). Přesné metabolické důvody tohoto pomalého růstu nejsou zcela objasněny, ale mohou být způsobeny kombinací několika faktorů. Mezi ně patří přítomnost pouze jediného operonu rRNA, složité požadavky na syntézu buněčné stěny, obtížný příjem živin a pomalá rychlost replikace DNA (Gordon a Parish, 2018).

Určujícím znakem těchto bakterií je přítomnost mykolových kyselin, a proto struktura buněčné stěny připomíná spíše gramnegativní bakterie, ačkoli je klasifikována jako grampozitivní (Gordon a Parish, 2018). Buněčná stěna obsahuje komplex mykolyarabinogalaktan-peptidoglykan (mAGP), který tvoří propojení peptidoglykanu, arabinogalaktanu a mykolových kyselin. Porozumění biosyntéze tohoto komplexu je důležité pro vývoj nových léčiv proti TBC (Brennan, 2003). Tato struktura zajišťuje odolnost vůči ATB a obsahuje řadu imunomodulačních molekul, jako jsou lipoarabinomannan, sulfolipidy a trehalosa dimykolát, které jsou nezbytné pro virulenci (Gordon a Parish, 2018). Podrobnosti o struktuře buněčné stěny MTB a o tom, jak reaguje na antituberkulotika, jsou uvedeny na obrázku č. 1.



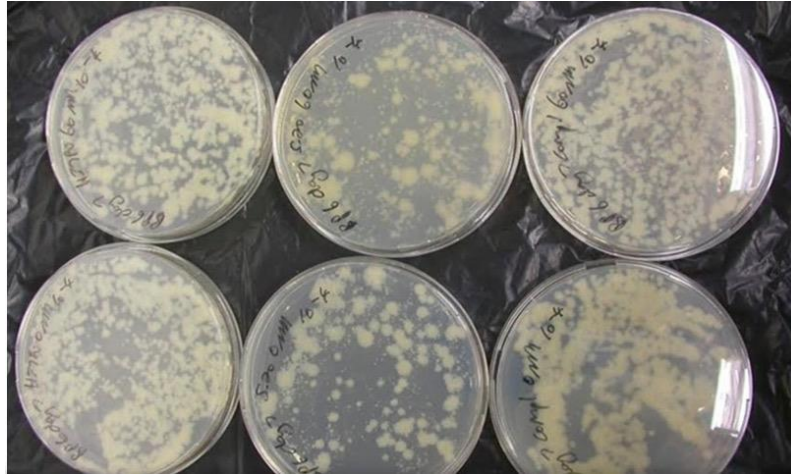
Obrázek 1: Interakce ATB s bakterií (Kia *et al.*, 2023)

Tuberkulózní bacily se pod světelným mikroskopem obvykle jeví jako rovné nebo mírně zakřivené tyčinky. Bacily mohou mít různou velikost a tvar, od kokobacilů až po protáhlé tyčinky, v závislosti na podmínkách růstu a stáří kultury. Velikost bacilů byla pozorována v rozmezí 0,2 až 0,6 μm na šířku a 1-10 μm na délku (obvykle 3-5 μm) (Velayati a Farnia, 2012). Kvůli přítomnosti kyseliny mykolové v buněčné stěně, bakterie je odolná proti Gramovým barvením, proto pro identifikace se používá buď kyselinostálá barviva (Ziehl- Neelsenovo barvivo), kdy tlustá a voskovitá buněčná stěna bakterie udržuje barvivo karbol fuchsin i při oplachování kyselým alkoholem nebo fluorescenční barviva (auramin) (viz obrázek č. 2) (Cudahy a Sheno, 2016).



Obrázek 2: *Mycobacterium tuberculosis* (CDC, 2006)

V optimálních laboratorních podmínkách při teplotě 37 °C se *M. tuberculosis* zdvojnásobuje každých 24 hodin a trvá přibližně 3 týdny, než vytvoří na agarových destičkách hrubé kolonie hnědošedé barvy (viz obrázek č. 3) (Gordon a Parish, 2018).



Obrázek 3: *Mycobacterium tuberculosis* na agaru (Shain, 2017)

2.1 Patogeneze tuberkulózy

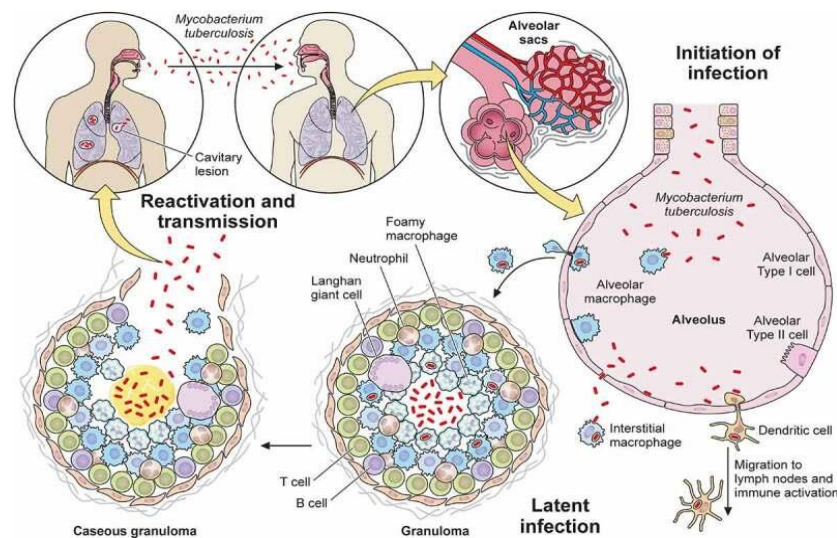
Kašláni, kýchání, mluvení nebo manipulace se sekrety a tkáněmi nakaženého pacienta mohou vést k šíření aerosolových kapek *M. tuberculosis*, které vstupují do lidského těla dýchacími cestami. Pravděpodobnost přenosu MTBC závisí na množství uvolněných bacilů, jejich koncentraci v prostoru, kterou ovlivňuje větrání, době expozice a na imunologickém stavu exponované osoby (Kia *et al.*, 2023).

Jakmile patogen pronikne do organismu, aktivuje se vrozená imunita v alveolárním prostoru, kde následná interakce buněk nespecifické imunity (makrofágy a dendritické buňky) s bakteriemi stimuluje adaptivní imunitu. Jejich společná reakce je přizpůsobena k zabíjení bakterií nebo omezení jejich množení v granulomech. Aktivní tuberkulóza se projeví buď ihned po primární infekci, nebo kvůli oslabení imunitního systému, například v důsledku HIV, používání imunosupresivních léků, chemoterapie, drogové nebo alkoholové závislosti atd. (Rahlwes *et al.*, 2023). Rozdíly mezi latentní a aktivní tuberkulózou jsou uvedeny v tabulce č. 1:

Tabulka 1: Rozdíl mezi latentní a aktivní tuberkulózou (Kia et al., 2023)

Pacient s latentní TBC	Pacient s aktivní TBC
Žádné příznaky	Chronický kašel, únava a slabost, horečka, noční pocení, ztráta hmotnosti a nechutenství
Není nakažlivý	Může infikovat ostatní
Pozitivní kožní test	Pozitivní kožní test a abnormální nálezy na rentgenu hrudníku

Přestože rentgenový snímek hrudníku často prokáže hlavní komplex, většina infekcí plicní tuberkulózou zůstává rentgenologicky i klinicky neodhalena. Pozitivní výsledek tuberkulinového kožního testu je nejčastějším ukazatelem, že došlo k infekci *M. tuberculosis* (Kia et al., 2023). Na obrázku číslo 4 můžeme vidět, jak bakterie infikují:



Obrázek 4: Infekce bakteriemi (Rahlwes et al., 2023)

Po pohlcení bakterie makrofágy a aktivaci dalších imunitních buněk dochází ke vzniku granulomů, což je charakteristický znak tuberkulózy. Zdraví jedinci jsou tak latentně infikováni, což znamená, že nemoc může být aktivována. Při nekrotizaci pěnových makrofágů se uvolňuje jejich lipidový obsah, což vede k zesýrovatění, neboli kaseifikaci, což je proces, při kterém se narušuje tuhá integrita granulomu v jeho jádru. Jakmile granulom roste, bacily začnou unikat z makrofágů do kaseinové vrstvy. Při následné reaktivaci se *M. tuberculosis*

množí a granulom praskne. Tím se vnitřní obsah uvolní do dýchacích cest, kde se bacily šíří do okolí ve formě kapének, a cyklus se tak znovu restartuje u nového hostitele (Alsayed a Gunosewoyo, 2023).

2.2 Typy tuberkulózních infekcí

Ačkoli tuberkulóza postihuje především dýchací systém, může infikovat i další orgány a buňky, včetně ledvin, mozku a páteře. Pokud není poskytnuta náležitá lékařská péče, může být tuberkulóza smrtelná. Existuje jedenáct různých druhů tuberkulózy, které podle lékařské klasifikace spadají do dvou kategorií plicní a mimoplicní tuberkulózy. Z nich sedm je způsobeno mimoplicní tuberkulózou a čtyři jsou způsobeny plicní tuberkulózou (Kia *et al.*, 2023). Vzniká v důsledku šíření bacilu *M. tuberculosis* do různých orgánů krevním řečištěm a lymfatickým systémem. Nejčastěji jsou postiženy pohrudnice, osteoartikulární systém a lymfatické uzliny (Ramírez-Lapausa *et al.*, 2015).

Přibližně 15 % tuberkulózních infekcí tvoří mimoplicní infekce. Stanovení diagnózy pouze na základě zobrazovacích znaků a klinických příznaků je náročné a často je nutná biopsie (Rodriguez-Takeuchi *et al.*, 2019). Mezi hlavní rizikové faktory vzniku mimoplicní tuberkulózy patří věk, ženské pohlaví, infekce HIV a souběžné onemocnění pacienta, jako je imunosuprese, cukrovka nebo chronické selhání ledvin. Ve srovnání s pacienty s plicní tuberkulózou mají pacienti s mimoplicní tuberkulózou vyšší průměrný věk. Pacienti s osteoartikulárním, genitourinárním a gastrointestinálním postižením a postižením lymfatických uzlin při extrapulmonální tuberkulóze bývají starší než pacienti, kteří získají pleurální nebo meningeální tuberkulózu (Ramírez-Lapausa *et al.*, 2015).

Tabulka 2: Druhy mimoplicní tuberkulóza (Ramirez-Lapausa et al., 2015)

Typ tuberkulózy	Popis	Místo poškození	Příznaky	Diagnostika
Miliární	- Hematogenní šíření nemoci do několika orgánů - Důsledek primární infekce (zejména u dětí) - Reaktivace latentního ložiska	Nejčastěji postižené orgány: - Játra - Slezina - Plíce - Lymfatické uzliny - Meningy - Kostní dřev - Nadledviny	- Septický šok - Syndrom multiorgánové dysfunkce - ARDS - Celkový neklid	- K průkazu postižení jater, sleziny a plic se používá CT - Odběr více vzorků na různých místech - Obvykle vyžaduje biopsii orgánu pro histologické a kulturační vyšetření
Lymfatických uzlin	Nejčastěji postihuje děti a mladé dospělé	- Nejčastější lokalizace: krční lymfadenopatie - Může postihnout nadklíčkové, axilární, hrudní a břišní uzliny	Může se projevit: - Nekrózou - Fluktuací - Zánětlivými příznaky - s ulcerací - Tvorbou píštělí - Skrofulózou	- Nutné provést FNAB postižené lymfatické uzliny - Mikrobiologické a cytologické vyšetření stěru - Kultivace a PCR - Pozorování kaseózního granulomu

Tabulka 2 pokračování: Druhy mimoplicní tuberkulóza (Ramirez-Lapausa et al., 2015)

Typ tuberkulózy	Popis	Místo poškození	Příznaky	Diagnostika
Osteoartikulární	<p>- Pottova choroba (spondylitida) tvoří polovinu všech případů</p> <p>- Může způsobit paravertebrální abscesy</p> <p>- Může utlačit míchu</p>	<p>- U mladších lidí: dolní hrudní oblast</p> <p>- U starších: horní bederní oblast</p> <p>- Tuberkulózní artritida: často koleno nebo kyčel</p>	<p>- Nejtypičtějším příznakem je místní nepohodlí</p> <p>- Otok, nepohodlí a ztráta funkce kloubů</p> <p>- Postupně se vyvíjejí během týdnů až měsíců</p> <p>- V pozdním stadiu často lokální deformace a omezený rozsah pohybu</p> <p>- Další příznaky zhoršení stavu kloubu</p>	<p>- CT a rentgenové vyšetření užitečné při určování rozsahu a postižení měkkých tkání</p> <p>- MRI nejpřesnější pro určení neurologického postižení</p> <p>- Biopsie pod CT kontrolou</p> <p>- Kultivace stěru má nízkou citlivost, ale pozitivní výsledky jsou časté (až 79 %)</p> <p>- V případě negativní kultivace může být nutná synoviální biopsie</p>

Tabulka 2 pokračování: Druhy mimoplicní tuberkulóza (Ramirez-Lapausa et al., 2015)

Typ tuberkulózy	Popis	Místo poškození	Příznaky	Diagnostika
Gastrointestinální a peritoneální	<p>Patogeneze:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hematogenní šíření z plicní nebo miliární tuberkulózy - Perorální přenos infekce <i>M. bovis</i> - Tuberkulóza proniká sliznicemi a způsobuje zánět a ulceraci - Peritonitida z reaktivace ložisek - Zvýšené riziko u cirhózy, diabetu, HIV, dialýzy 	Kteroukoli část trávicího systému	<ul style="list-style-type: none"> - Nejčastější příznak: bolest břicha - Někteří lidé mají nahmatatelnou břišní masu - Další příznaky: nechutenství, vyčerpanost, horečka, noční pocení, úbytek hmotnosti, průjem, zácpa, krev ve stolici 	<ul style="list-style-type: none"> - Diferenciální diagnostika nezbytná kvůli možné píštěli a zúžení střeva - Konečná diagnóza pomocí kultivace, histologie a CT - Kolonoskopie s biopsií nejlepší - V 80 % případů pozitivní výsledky kultivace peritoneální tekutiny - Pokud ne, laparoskopická biopsie nebo biopsie pod CT

Tabulka 2 pokračování: Druhy mimoplicní tuberkulóza (Ramirez-Lapausa et al., 2015)

Typ tuberkulózy	Popis	Místo poškození	Příznaky	Diagnostika
Centrálního nervového systému	<ul style="list-style-type: none"> - Hematogenní šíření způsobuje tuberkulózu CNS - Vysoká morbidita a mortalita - Nejčastější: tuberkulózní meningitida - Další: intrakraniální tuberkulom, cévní trombóza, ischemická mrtvice 	CNS	<ul style="list-style-type: none"> - Tuberkulózní meningitida: bolesti hlavy, malátnost, letargie, kóma - Bez léčby úmrtí do 5-8 týdnů - Intrakraniální tuberkulom: asymptomatický nebo záchvaty, bolesti hlavy, neurologické poruchy 	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnóza tuberkulózní meningitidy: vyšetření mozkomíšního moku - Zvýšená koncentrace bílkovin - Snížená koncentrace glukózy - Intrakraniální tuberkulom: stereotaktická biopsie - Hydrocefalus: nutný chirurgický zákrok
Močových cest	<ul style="list-style-type: none"> - Častější u mužů než u žen - Postižení ledvin: hematogenní rozsev během první fáze plicní infekce 	Močové cesty	<ul style="list-style-type: none"> - 90 % případů: asymptomatický rozvoj genitourinární tuberkulózy - Příznaky z dolních cest močových: sterilní pyurie, 	<ul style="list-style-type: none"> - Zobrazovací vyšetření: echografie, intravenózní pyelogram, CT - Odhalí kalcifikace, papilární nekrózu, postižení

	- Infekce může proběhnout při pozdní reaktivaci nebo miliární nemoci		mikroskopické krvácení - Šíření do močovodu - Ureterická striktura může způsobit obstrukční uropatii a hydronefrózu	kalichů, strikturu ureteru, dilataci pánvičky - Mikrobiolo- gická diagnóza: barvení a kultivace moči pro detekci tuberkulózních bacilů
--	---	--	--	--

3 Léčba a prevence

3.1 Léčba

Nejnovější doporučení WHO pro léčbu pacientů s TBC citlivou na léky byla navrhována v roce 2021. V souladu s těmito doporučeními se šestiměsíční režim, který zahrnuje čtyři léky první linie TBC (Kia *et al.*, 2023). Tato kombinace obsahuje isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamid (PZA) a ethambutol (EMB) a podává se po dobu šesti měsíců. Léčba je rozdělena do dvou fází: první trvá dva měsíce a spočívá v podávání čtyř výše uvedených léků; ve druhé fázi jsou pacienti léčeni INH a RIF po dobu posledních čtyř měsíců, aby došlo k usmrcení spících bakterií (Alsayed a Gunosewoyo, 2023). Delší léčba může být nutná u mimoplicních a diseminovaných forem tuberkulózy: tuberkulóza lymfatických uzlin 6 měsíců, kloubní nebo kostní tuberkulóza 9 měsíců a tuberkulóza centrálního nervového systému 12 měsíců (Suárez *et al.*, 2019).

Tabulka 3: Léčba tuberkulózy antibiotiky (Suárez *et al.*, 2019)

ATB	Délka léčby (měsíce)	Dávkování (mg/kg)	Minimální/maximální dávka (mg)
INH	6	5	200/300
RMP	6	10	450/600
PZA	2	25	1500/2000
EMB	2	15	800/1600

Multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB) je termín používaný pro označení bakterií tuberkulózy, které jsou rezistentní vůči více lékům proti tuberkulóze, jako jsou isoniazid (INH) a rifampicin (RIF). Fluorochinolon je spolu s amikacinem, kanamycinem a kapreomycinem jedním z nejméně tří injekčních intravenózních léků druhé linie. Tento typ vzácné MDR-TB je znám jako extenzivně lékově rezistentní TBC (XDR-TB) (Kia *et al.*, 2023). Pacienti postižení tuberkulózou, která je rezistentní vůči léčbě, vyžadují individuální přístup k léčbě, který zahrnuje léky druhé linie a další antituberkulotika. Tento přístup by měl být navržen na základě testů citlivosti na léčiva. Používání léčby na základě odhadu bez testů může zhoršit situaci a vést k další rezistenci (ECDC, 2018).

Tabulka 4: Postup léčby pro MDR-TB (Seung, 2015)

1. krok	Výběr léku na základě senzitivity a anamnézy léčby. Streptomycin se obecně nepoužívá z důvodu vysoké míry rezistence u pacientů s MDR-TB.	Injekční léčiva druhé linie: <ul style="list-style-type: none"> • Amikacin • Kapreomycin • Kanamycin
2. krok	Přidat fluorochinolon novější generace. Je-li rezistence na ofloxacin, použít moxifloxacin.	Fluorochinolony: <ul style="list-style-type: none"> • Levofloxacin • Moxifloxacin
3. krok	Přidat léky druhé linie, které budou pravděpodobně účinné	<ul style="list-style-type: none"> • Kyselina p - aminosalicylová • Ethionamid/Prothionamid • Cykloserin/Terizidon
4. krok	Pyrazinamid se přidává rutinně, s výjimkou případů, kdy je pacient intolerantní nebo kdy je na základě anamnézy vysoce pravděpodobná rezistence. Pokud etambutol splňuje podmínky účinnosti, také se přidává do léčebného režimu.	Přídavná léčiva (nejsou součástí základního režimu u MDR-TB): <ul style="list-style-type: none"> • Pyrazinamid • Ethambutol
5. krok	Pokud výše uvedené léky nejsou pro pacienta účinné, přidávají se další léky.	<ul style="list-style-type: none"> • Bedaquilin • Linezolid • Klofazimin • Amoxicillin-klavulanát • Imipenem-cilastatin

3.2 Prevence

Klíčem k zastavení šíření tuberkulózy je prevence. Ta zahrnuje očkování, prevenci aktivního onemocnění u latentně infikovaných osob a včasné odhalení a léčbu aktivní tuberkulózy, aby se zastavila infekčnost (Heemskerk *et al.*, 2015).

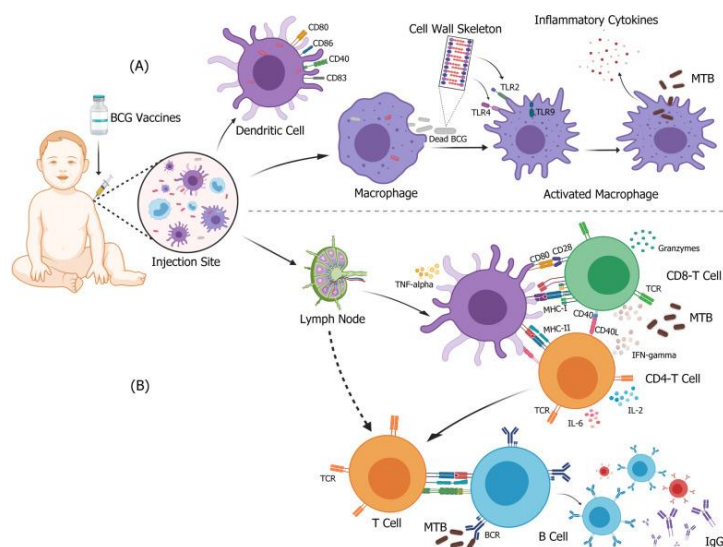
Mezi rizikové faktory nákazy a onemocnění TBC patří blízký kontakt s aktivním případem plicní TBC, infekce HIV, neléčené neaktivní onemocnění, základní zdravotní stav, alkoholismus aj. (Toth *et al.*, 2004).

Pokud je pacient s tuberkulózou současně HIV pozitivní, doporučuje se okamžité zahájení antiretrovirové terapie a zahájení léčby tuberkulózy co nejdříve. Také je důležité v případech preventivní léčby zvážit typ lékové rezistence a hladinu lymfocytů CD4. Léčba může zahrnovat různé režimy, jako je isoniazid po dobu 6 nebo 9 měsíců, nebo kombinaci rifampicinu s isoniazidem, a další (ECDC, 2017).

3.2.1 Vakcinace proti TBC

Vakcína Bacillus Calmette-Guerin (BCG), která byla poprvé vyvinuta v roce 1921 a byla vytvořena sériovou pasáží *Mycobacterium bovis*, je jedinou v současnosti používanou vakcínou proti TBC (Heemskerk *et al.*, 2015). Očkování živou oslabenou mykobakteriální vakcínou BCG stimuluje lokální infekci a imunologickou aktivaci v místě vpichu, kde dendritické buňky, makrofágy a monocyty detekují bakterie a vytvářejí silnou imunologickou odpověď (Li *et al.*, 2021).

Buněčná stěna BCG a další složky fungují jako receptory pro rozpoznávání vzorů (PRR), navazují se na různé ligandy a zvyšují expresi kostimulačních molekul v aktivovaných buňkách a spouštějí vrozenou imunitní odpověď na tuberkulózu. Aktivované dendritické buňky se přesouvají do lymfatických uzlin, kde stimulují Th1 CD4+ a CD8+ T-buňky, které jsou specifické pro mykobakterie. To má za následek uvolnění vysoké úrovně cytokinů, včetně granzymu a IFN-gama. Kromě toho jsou v reakci na antigeny BCG produkovány buňkami B paměťové buňky, plazmatické buňky a antigen- specifické protilátky (viz obrázek č. 5) (Li *et al.*, 2021).



Obrázek 5: BCG vakcinace a imunitní odpověď (Li et al, 2021)

3.2.1.1 Vakcinace v České republice a Kazachstánu

Vzhledem k nízkému výskytu tuberkulózy v České republice, který se pohybuje v řádu stovek případů ročně, byla v roce 2010 plošná BCG vakcinace nahrazena selektivní vakcinací rizikových jedinců. Podle zákona č. 48/1997 Sb., o veřejném zdravotním pojištění, se očkování provádí u dětí do šesti týdnů věku bez nutnosti tuberkulinového testu, pokud byly v kontaktu s nemocným s tuberkulózou (například členem rodiny). U dětí starších šesti týdnů se očkování provádí až po negativním výsledku tuberkulinového testu (Městská nemocnice Ostrava).

Oddělení hygienické a epidemiologické kontroly města Almaty informuje, že v Kazachstánu je očkování proti tuberkulóze povinné a plně hrazené státem. První dávka se podává 1-4 dny po narození a druhá ve věku šesti let.

Hlavní rozdíly mezi Kazachstánem a Českem jsou dva. Za prvé, v České republice není vakcinace proti tuberkulóze povinná, protože se předpokládá, že vakcína je účinná pouze v prvním roce života a má minimální efekt pro dospívající a dospělé. Za druhé, pokud je dítě v Česku očkováno proti tuberkulóze do jednoho roku věku, není toto očkování hrazeno státem a náklady nesou rodiče dítěte.

4 Tradiční metody detekce tuberkulózních bakterií a jejich modifikace

Pro identifikaci mykobakterií bylo vyvinuto mnoho technik, od nejjednodušších laboratorních testů až po nejsložitější molekulární a nemolekulární postupy (Kia *et al.*, 2023). Zavedení rychlých identifikačních metod založených na molekulární analýze a automatizovaných systémů pro kultivaci bakterií v tekutých kulturách výrazně zkrátilo dobu potřebnou k růstu mykobakterií (Singh a Kabra, 2019).

Molekulární testy změnil v posledních deseti letech oblast diagnostiky tuberkulózy. Patogen lze zjistit během několika hodin díky molekulární identifikaci mykobakteriální DNA pomocí testů, jako je GenXpert MTB/RIF nebo testy s liniovou sondou. Je to významné proto, že tyto testy detekují také indikátory rezistence, což pomáhá identifikovat osoby, které mají tuberkulózu rezistentní vůči lékům (Heyckendorf *et al.*, 2020).

4.1 Kultivace

Hlavní a neúčinnější způsob diagnostiky TBC je kultivace, která je známá po celém světě a zajišťuje definitivní identifikaci přítomnosti tohoto patogenu (Gill *et al.*, 2022). Protože však *Mycobacterium tuberculosis* roste pomalu a kolonie tvoří jen pomalu, je pěstování těchto bakterií obtížné. Pro dosažení co nejlepších výsledků se doporučuje použít kombinaci jednoho tekutého a jednoho pevného média (Pagaduan *et al.*, 2023).

Ve dvouleté studii publikované v roce 1975 byla porovnávána čtyři kultivační média Lowenstein-Jensen (LJ), Middlebrook (7H10), Petragani a RNA. Výsledky ukázaly, že média LJ a RNA jsou nejvhodnější pro běžnou praxi. Jako média pro izolaci MTBC se navrhuje Middlebrookovy bujóny nebo pevná média, stejně jako média na bázi vajec nebo agarů obohacená zeleným malachitem. Obvykle trvá 3-8 týdnů, než kultury vytvořené z klinického materiálu vykazují známky růstu. Před kultivací jsou vzorky zpracovány pomocí N-acetyl-L-cystein-hydroxidu sodného, aby nedošlo ke kontaminaci jinými bakteriemi a houbami (Pagaduan *et al.*, 2023).

Citlivost *Mycobacterium tuberculosis* na léčiva pozorujeme v kultivačním médiu obohaceném o antituberkulotika, což vede k detekovatelným metabolickým změnám. V dnešní době jsou k dispozici automatické systémy, které umožňují rychlou detekci pomocí tekutých médií. Tyto systémy, jako například BacT/ALERT 3D (Biomérieux), BACTEC MGIT (Becton Dickinson) a VersaTREK (Thermo Fisher), byly schváleny americkou agenturou FDA. Při detekci MTBC tyto systémy monitorují buď produkci oxidu uhličitého (CO₂) nebo spotřebu kyslíku (O₂). Tímto způsobem se získává důležitá informace o citlivosti MTBC na léčiva (Gill *et al.*, 2022).

Kultivace mykobakterií má řadu nevýhod, jako doba potřebná k detekci může trvat až dva měsíce, což zpomaluje diagnózu aktivní tuberkulózy u mnoha pacientů (Heyckendorf *et al.*, 2020).

I když není kultivace doporučována jako primární test, stále má důležitou roli v diagnostice tuberkulózy, protože trvalé pozitivní výsledky kultivace mohou naznačovat možnost návratu onemocnění po jeho léčbě (Gill *et al.*, 2022).

4.2 Mikroskopie

Jednou z rychlých a jednoduchých metod hodnocení bakteriologického průkazu mykobakterií je mikroskopická analýza stěrů ze sputa (SSM) (Pagaduan a Altawallbeh, 2023).

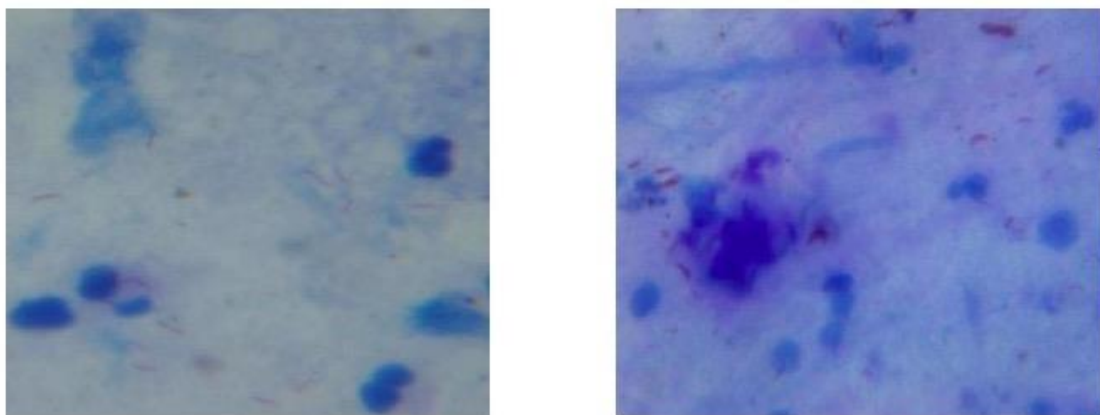
V posledních 100 letech se tuberkulóza diagnostikuje pomocí metody SSM. Metoda SSM je necitlivá, zjistí se pouze 50 % případů a každý vzorek vyžaduje deset minut reálného času na zpracování (Pandey *et al.*, 2019).

Ve vnější membráně acidorezistentních mykobakterií se nacházejí mykolové kyseliny, které využívá Ziehl-Neelsenovo, Kinyounovo a Auramin-Rhodaminové barvení nebo barvení na acidorezistentní bakterie Fluorochrom. Karbol-fuchsin se používá v Ziehl-Neelsenově a Kinyounově technice. Hlavní rozdíl mezi oběma technikami spočívá v tom, že zatímco při druhé technice se používají vyšší koncentrace barviva a nepoužívá se teplo, při první technice se teplo používá. I po promytí kyselým alkoholem se acidorezistentní bacily při působení

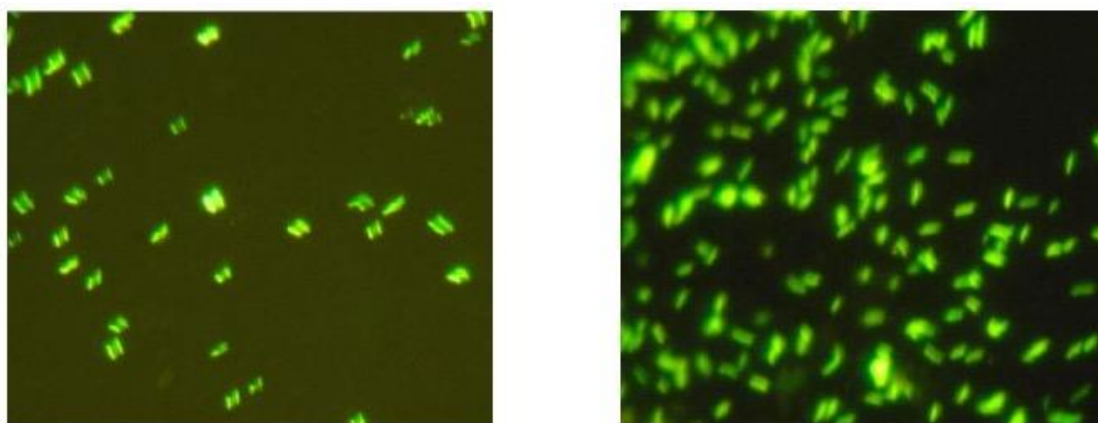
karbolfuchsinu zbarví do červena. K analýze preparátů lze použít mikroskopii s jasným polem (Pagaduan a Altawallbeh, 2023).

Fluorescenční barviva rhodamin B a auramin O také vážou mykologové kyseliny, které jsou pak identifikovány fluorescenční mikroskopií (FM) (Pagaduan a Altawallbeh, 2023). Vzhledem k tomu, že AFB fluorescence má silnější kontrast než ZN (1000x), lze preparáty vyšetřovat při menším zvětšení (200x nebo 400x) a kontrolovat je rychleji, což snižuje nadměrnou pracovní zátěž v některých laboratořích. Kromě toho je barvení FM jednodušší a výroba auraminového roztoku je snazší a protože k vidění bacilů není nutný žádný imerzní objektiv, není potřeba používat imerzní olej a xylen, které jsou nejen nákladné, ale také mohou poškodit objektivy kvůli jejich nevhodnému použití nebo nedostatečné kvalitě (Masali *et al.*, 2021).

Proto, od roku 2011 Světová zdravotnická organizace doporučila postupně nahradit Ziehl-Neelsenovu mikroskopii fluorescenční mikroskopií s LED diodami. FM má více výhod než ZN, protože detekuje přibližně o 5-10 % více acidorezistentních bacilů (AFB) než ZN. Pokud jde o nevýhody fluorescenční mikroskopie, lze zmínit především její vysoké náklady a složitost mikroskopu. K tomu patří potřeba tmavé místnosti, zdravotní rizika spojená s expozicí UV záření, relativně vysoká cena, krátká životnost a potřeba stabilního elektrického napájení osvětlovacích systémů s rtuťovou lampou. Navíc může být obtížné sehnat nové žárovky pro tyto systémy (Masali *et al.*, 2021).



Obrázek 6: Mikrofotografie nátěru ze sputa zbarveného ZN ukazující tuberkulózní bacily (1000x) jako jasně růžové až červené, korálkové nebo pruhované formy, zatímco buňky tkání jsou zbarveny modře (Acharya a Vyas, 2018)



Obrázek 7: Mikrofotografie nátěru sputa obarveného fluorescenčním barvivem pomocí LED mikroskopie (400x), kde bacily září žlutě na tmavém pozadí (Acharya a Vyas, 2018)

5 Moderní metody detekce tuberkulózních bakterií za poslední 10 let

5.1 Molekulární testy

Molekulárně biologické technologie umožnily rychlejší diagnostiku tuberkulózy ve srovnání s tradičními metodami kultivace a mikroskopie (Gopaldaswamy *et al.*, 2020). Tyto moderní molekulární testy se zaměřují především na genetický materiál specifický pro *Mycobacterium tuberculosis* přítomný v DNA i RNA a využívají amplifikační techniky, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR) a sekvenování, nebo hybridizaci nukleových kyselin k identifikaci genových mutací spojených s rezistencí vůči lékům proti tuberkulóze (WHO, 2016).

5.1.1 Test amplifikace nukleových kyselin (NAAT)

Rychlá molekulární technika pro identifikaci nukleových kyselin genetického materiálu umožňuje detekci i malého množství genetického materiálu organismu ve specifickém vzorku. Součástí metody NAAT je screening na inhibici amplifikace (Kia *et al.*, 2023).

Standardní testy NAAT používané v molekulární diagnostice *M. tuberculosis*:

- GenoType Line Probe Assays (LPA)
- GeneXpert MTB/RIF
- Seegene Anyplex MTB/NTM
- Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology
- Whole-Genome Sequencing (WGS)

5.1.1.1 GenoType Line Probe Assays (LPA)

Za nejvhodnější pro rychlou diagnostiku se považují molekulární testy, které lze provádět přímo na diagnostických vzorcích, jako je LPA. Reverzní hybridizace a PCR jsou dvě techniky amplifikace nukleových kyselin, které LPA používá k rychlé identifikaci variant rezistence na léky (WHO 2022).

Byly provedeny různé studie, kde bylo dokázáno význam metody amplifikace polymerázového řetězce (LPA) při diagnostice tuberkulózy. Výsledky naznačují, že testy LPA vykazují vyšší senzitivitu a jsou schopny s větší účinností detekovat přítomnost *M. tuberculosis* ve vzorcích sputa ve srovnání s tradiční metodou detekce, jako je mikroskopie. I přesto, že testy LPA jsou účinné mají svá omezení při detekci *M. tuberculosis* v určitých vzorcích sputa. To zdůrazňuje důležitost použití více diagnostických metod pro přesné posouzení MDR-TB (Ebonyi *et al.*, 2020).

GenoType MTBDRplus a INNO-LiPA Rif TB jsou dva cenově dostupné LPA testy. Oba tyto testy byly schváleny WHO díky své schopnosti vysokého rozpoznání rezistence na rifampicin a možnosti okamžité identifikace mutací (Záporojan *et al.*, 2024).

5.1.1.2 GeneXpert MTB/RIF

V roce 2014 schválila WHO test Xpert MTB/RIF, který využívá technologii PCR k detekci tuberkulózy a její rezistence na rifampicin. Součástí kazety MTB/RIF jsou komponenty potřebné k amplifikaci a detekci jedinečné DNA bakterie *M. tuberculosis* a také k identifikaci mutací spojených s rezistencí na antituberkulotika. Při použití kazety lze test MTB/RIF provést rychle a bez nutnosti časově náročné přípravy, což je vhodné pro použití v terénních laboratořích nebo na místech s omezenými zdroji. To pomáhá účinně diagnostikovat a léčit onemocnění (Záporojan *et al.*, 2024).

Tento test zcela změnil způsob, jakým byla tuberkulóza rezistentní k rifampicinu včas vyšetřována a potvrzována. Snížení limitu detekce (Xpert MTB/RIF Ultra) a hodnocení více genů souvisejících s rezistencí byly dalšími kroky ve vývoji molekulárních testů, které rovněž zlepšily diagnostiku tuberkulózy u dětí (Günther *et al.*, 2022). Navzdory vyšší citlivosti testu Xpert MTB/RIF Ultra má tento test nižší specifitu než test Xpert MTB/RIF, protože nedokáže přesně rozlišit mezi DNA neaktivní a aktivní tuberkulózy (Gill, 2020).

Světová zdravotnická organizace doporučuje používat tento test u osob, které mohou být současně infikovány virem HIV nebo u nichž existuje podezření na multirezistentní tuberkulózu. V prostředí s nízkým výskytem tuberkulózy se test Xpert MTB/RIF doporučuje používat místo přímé mikroskopie stěru vzhledem k jeho citlivosti a specifičnosti, které jsou

pro diagnostiku plicní tuberkulózy u dospělých zhruba 90 %, resp. 98 %. Navíc na rozdíl od dřívějších doporučení CDC, která vyžadovala izolaci až do tří negativních výsledků stěru ze sputa k vyloučení nakažlivé tuberkulózy, nová doporučení uvádějí, že k vyloučení plicní tuberkulózy stačí jedno nebo dvě negativní zjištění pomocí testu Xpert MTB/RIF (Záporojan *et al.*, 2024).

Navzdory úspěšným výsledkům testu Xpert MTB/RIF je jeho hlavní nevýhodou vysoká finanční náročnost spojená s pořízením zařízení a nákupem spotřebního materiálu. Z tohoto důvodu byl navržen alternativní molekulární test TB-LAMP (Záporojan *et al.*, 2024).

5.1.1.3 Technologie izotermického zesílení zprostředkovaného smyčkou (LAMP)

LAMP je další molekulární test, který je ve srovnání s PCR testem rychlejší a levnější a používá se ke zjištění mutací rezistence na léky (Záporojan *et al.*, 2024). To je jediný test amplifikace DNA, který je nezávislý na teplotě a jeho kritéria biologické bezpečnosti jsou srovnatelná s kritérii mikroskopie výtěru ze sputa. Technici nepotřebují k používání TB-LAMP téměř žádné školení, protože nálezy lze prohlížet pouhým okem nebo pod UV světlem a jsou hotové do dvou hodin (Promsena *et al.*, 2022).

Reakce probíhá při konstantní (izotermické) konstantní teplotě 65°C po dobu 15 až 60 minut, kde čtyři různé primery jsou přesně navrženy tak, aby rozpoznaly šest různých úseků cílového genu. Tento test lze provádět opakovaně, dokud se nevytvoří významné množství amplikonů, protože není citlivý na hromadění vedlejších produktů DNA nebo pyrofosfátových solí. Spolu s tím, že proces amplifikace je viditelný pouhým okem, to také umožňuje použití dvouřetězcových DNA barviv, jako je SYBR Green. LAMP test zahrnuje tři kroky: Začíná se přípravou vzorku, což trvá 10 až 20 minut. Následuje čtyřicetiminutová amplifikace, a nakonec vizuální detekce fluorescence pomocí ultrafialového světla, která zabere 0,5 až 1 minutu (Inbaraj *et al.*, 2023).

Specifičnost testu dosahuje hodnot mezi 97 % a 98 %, což znamená, že je schopen s velkou přesností identifikovat zdravé jedince. Nicméně jeho citlivost se pohybuje mezi 76 % a 80 %, což je o něco nižší ve srovnání s testem Xpert MTB/RIF (Inbaraj *et al.*, 2023).

Navzdory LAMP test nevyžaduje vysoké náklady nedokáže detekovat kmeny rezistentní na léky (Zaporojan *et al.*, 2024).

5.1.1.4 Seegene Anyplex MTB/NTM

V Jižní Koreji byla vyvinuta společností Seegene metoda pro přesné identifikaci tuberkulózy a netuberkulózních mykobakteriálních infekcí. Tento test je významný tím, že je schopen identifikovat rezistenci na léky (MDR-TB), což umožňuje poskytnout efektivní léčbu pro pacienta (Zaporojan *et al.*, 2024). Za méně než 3 hodiny lze detekovat MTBC z různých typů vzorků jako sputum, aseptické tekutiny (pleurální tekutina, krev a kostní dřeň), vzorky bronchiální laváže atd. (Sali *et al.*, 2016).

Bylo zjištěno, že test Seegen Anyplex MTB/NTM pro detekci v reálném čase je vhodným diagnostickým nástrojem pro identifikaci a rozlišení netuberkulózních a tuberkulózních mykobakterií. V různých výzkumech byly provedeny testy na citlivost a specifitu detekce TBC. Nedostatečná detekční citlivost ve studii provedené Chotmongkol Verajitem a jeho kolegy mezi TBC a non-TBC vede k doporučení, aby byl test Seegen Anyplex MTB/NTM pro detekci v reálném čase používán spíše k definitivní diagnóze než k rozhodování o léčbě (Chotmongkol *et al.*, 2024).

5.1.1.5 Sekvenování celého genomu (WGS)

Nedostatečná schopnost identifikovat klinicky významné mutace mimo oblast určující rezistenci k rifampicinu genu *rpoB* omezuje účinnost testů NAAT a LPA při identifikaci rezistence k léčivům, přestože se jedná o rychlé a snadné diagnostické postupy (Gill *et al.*, 2022).

V roce 1998 se podařilo studovat sekvenování celého genomu H37Rv, což bylo významným pokrokem při studiu tuberkulózních bakterií a vytváření nových léčebných a preventivních opatření (Wang *et al.*, 2022). Genom *M. tuberculosis* s 4 411 529 páry bází a více než 4 000 geny má pozoruhodně vysokou koncentraci guaninu a cytosinu (Zaporojan *et al.*, 2024).

Moderní technologie pro diagnostiku *M. tuberculosis* je WGS, která umožňuje důkladné zkoumání genetické struktury bakterií a přesné určení pořadí nukleotidů v celém genomu organismu, což usnadňuje identifikaci všech mutací v genomu (Zaporojan *et al.*, 2024).

V rámci různých výzkumů týkajících se odolnosti MDR vůči antituberkulotikům tato technika prokázala vysokou specifitu a senzitivitu, dosahující až 94,7 %. Na druhou stranu, identifikace XDR vykázala senzitivitu pouze 40,0 %, ale specifitu 99,3 % (Zaporojan *et al.*, 2024).

5.2 Imunologické testy

5.2.1 Test lipoarabinomannanu v moči (TB-LAM)

Lipoarabinomannan, klíčová a tepelně stabilní složka buněčné stěny *M. tuberculosis*, se vylučuje močí některých pacientů trpících tuberkulózou. Důležitý lipoglykan mykobakteriální buněčné stěny lipoarabinomannan (LAM), který řídí imunitní odpověď hostitele, je faktorem virulence mnoha mykobakterií (Ketema *et al.*, 2022).

Jednou z diagnostických metod pro diagnostiku infekce *M. tuberculosis* je test na lipoarabinomannan v moči (TB-LAM). Cílem tohoto testu je zjistit lipoarabinomannan, kde při testovací metodě pacient poskytne vzorek moči, který je následně analyzován pomocí speciálních technik ke zjištění přítomnosti LAM (Zaporojan *et al.*, 2024).

Tuto metodu se doporučuje používat jako rychlý test u HIV pozitivních osob, a to i přes jeho omezenou citlivost, zejména v naléhavých případech, kdy je rychlá diagnóza tuberkulózy rozhodující pro přežití pacienta. Ale přítomnost mykobakteriálního antigenu LAM v moči neindikuje rezistenci na léčbu (Ketema *et al.*, 2022).

5.2.2 Test uvolňování interferonu-gama (IGRA)

Latentní tuberkulóza a infekce *M. tuberculosis* se diagnostikují pomocí testů uvolňování interferonu gama (IGRA). Tyto testy hodnotí reakci imunitního systému na určité antigeny MTBC, jako jsou proteiny ESAT-6 a CFP-10, které nejsou přítomny ve většině netuberkulózních kmenů mykobakterií ani ve vakcíně BCG (Zaporojan *et al.*, 2024). Tento test je výhodnou alternativou k TST. Nicméně oba testy mají sníženou citlivost. TST má několik nevýhod, jako jsou falešně pozitivní a negativní výsledky u BCG vakcinovaných pacientů nebo u infekce netuberkulózními mykobakteriemi (Pai *et al.*, 2014).

Test QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) a test T-SPOT.TB jsou dva komerční IGRA, které jsou dostupné v mnoha zemích. Oba testy jsou registrovány jako CE (Conformité Européenne), což znamená, že jsou schváleny pro použití v Evropě jak kanadským úřadem Health Canada, tak americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA)

(Pai et al., 2014). V roce 2017 povolil úřad FDA QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus), čtvrtou generaci QFT testu, který nahradil předchozí QFT-GIT. QFT-GIT obsahuje kombinaci syntetických peptidů odpovídajících třem antigenům *M. tuberculosis*: TB 7.7, CFP- 10 a ESAT- 6. QFT-Plus oproti tomu využívá dva antigeny, TB1 a TB2. Dlouhé peptidy CFP-10 a ESAT-6 v obou zkumavkách QFT-Plus aktivují pomocné T-buňky CD4+, zatímco krátké peptidy ESAT-6 a CFP-10 v TB2 rovněž aktivují cytotoxické T-buňky CD8+. Přítomnost CD8+ lymfocytů signalizuje nedávnou infekci *M. tuberculosis* (Venkatappa *et al.*, 2019).

Podle výzkumu zaměřeného na citlivost testů u pacientů s aktivní tuberkulózou nebyl mezi QFT-Plus a QFT-GIT žádný výrazný rozdíl. Při srovnání QFT-Plus s QFT- GIT a T- SPOT.TB nebyl mezi osobami s velmi nízkým rizikem expozice tuberkulóze prakticky žádný rozdíl ve specificitě. QFT-Plus lze levně a pohodlně používat v klinickém prostředí. Metody obou testů jsou však z hlediska snadnosti použití a cenové dostupnosti srovnatelné, takže není výrazná preference pro použití QFT-Plus oproti QFT-GIT (Zhang *et al.*, 2023).

6 Porovnání tradičních a moderních metod

Tradiční metody mají stále klíčový význam v detekci tuberkulózy, avšak současně dochází k vývoji nových moderních metod, které využívají molekulární a imunologické techniky. Pro porovnání těchto metod je níže uvedena tabulka č 5, která obsahuje údaje o citlivosti a specifitě jednotlivých metod, spolu s jejich výhodami a nevýhodami:

Tabulka 5: Tradiční a moderní metody detekce

Tradiční metody	Popis metody	Výhody	Nevýhody
Screening příznaků	Screening příznaků a známek tuberkulózy, mezi které patří horečka, noční pocení, kašel, hemoptýza, úbytek hmotnosti, bolest na hrudi a dušnost	Levná, snadno realizovatelná	Nízká senzitivita a specifita
Rentgen hrudníku	Zobrazovací metoda, která umožňuje identifikovat abnormality plic	- Levná a v současné době se používá na mnoha místech - Rychlá	- Nízká specifita a citlivost - Nelze vyšetřit EPT
Mikroskopie sputa	Mikroskopie stěru ze sputa v jasném poli pomocí ZN barvení	- Levná s nízkými technickými požadavky - Snadno realizovatelná - Vysoká specifita	- Časově náročná - Nízká citlivost u HIV pozitivních
Kultivace	Kultivace na pevném médiu (Lowenstein-Jensen)	- Vyšší citlivost oproti mikroskopie - Levná metoda - Citlivost na léky	- Časově náročná (do 8 týdnů) - Vyžaduje větší laboratorní vybavenost

Tabulka 6 pokračování: Tradiční a moderní metody detekce

Moderní metody	Popis metody	Výhody	Nevýhody
Fluorescenční mikroskopie	Fluorescenční mikroskopie s LED diodami	- Detekuje o 5-10 % více AFB než ZN - Rychlejší a jednodušší než světelná mikroskopie	- Vysoké náklady a složitost mikroskopu
Kultivace v tekutém médiu	BACTEC MGIT	- Citlivost o 10% vyšší - Rychlejší	- Potřeba speciálního vybavení - Stálé časově náročná - Vyškolení odborníci
NAAT (Test amplifikace nukleových kyselin)	LPA	- Vysoká senzitivita a specifita - Lze provést přímo na vzorcích pacienta	- Drahá
	GeneXpert MTB/RIF	- Rychlá - Detekce rezistence na RIF - Vysoká specifita - Vysoká citlivost u HIV pozitivních	- Vysoká finanční náročnost
	LAMP	- Nepotřebuje žádné školení - Rychlejší a levnější - Vysoká specifita	- Nižší citlivost ve srovnání s Xpert MTB/RIF - Nedokáže detekovat rezistence na léky
	Seegene Anyplex MTB/NTM	- Detekce rezistence na léky - Rychlá	- Nedostatečná detekční citlivost

		- Rozlišení netuberkulózních a tuberkulózních bakterií	
	WGS	- Možnost zkoumání genetické struktury bakterie - Vysoká specifita a senzitivita - Detekce rezistence na léky - Rychlá	- Drahá
TB-LAM (Test lipoarabinomannanu v moči)	Detekce složky buněčné stěny bakterie v moči pacienta trpící tuberkulózou	- Rychlý test, doporučuje se u HIV pozitivních osob - Jednoduchá	- Neindukuje rezistence na léčbu - Nízká citlivost
IGRA (Testy uvolňování interferonu gama)	Měří množství interferonu gama, který bílé krvinky produkují v reakci na přítomnost TBC	Používá se izolované krevní buňky (T-SPOT.TB) a plnou krev (QFT-GIT), nepotřebuje sputum	Nízká specifita a senzitivita pro diagnózu aktivní tuberkulózy

Závěr

Tato práce se zaměřila na analýzu metod detekce tuberkulózy a na popis původce této nemoci, bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Byla popsána historie objevu bakterie a její současný výskyt, včetně dopadů migrace způsobené válkou mezi Ruskem a Ukrajinou.

Detailně bylo popsána charakteristika bakterie, zejména její buněčná stěna, která je klíčovým faktorem její odolnosti vůči lékům a náročnosti kultivace a detekce. Byly rozebrány různé druhy mimoplicní tuberkulózy, což ukazuje na komplexnost této nemoci.

Dále byla popsána léčba tuberkulózy pomocí antibiotik a preventivní opatření včetně očkování. Bylo provedeno srovnání výskytu tuberkulózy mezi Kazachstánem a Českou republikou, s důrazem na očkování BCG. Bylo zjištěno, že v Kazachstánu je očkování BCG stále povinné oproti Česku.

Tradiční metody detekce tuberkulózy, jako je mikroskopie a kultivace, byly doplněny o moderní molekulární metody, které představují velký pokrok v diagnostice této nemoci, i když jsou často finančně náročné.

Závěrem lze říci, že efektivní detekce a léčba tuberkulózy vyžaduje kombinaci tradičních a moderních metod a je nezbytné věnovat pozornost epidemiologickým i sociálním faktorům, které ovlivňují šíření této nemoci.

POUŽITÁ LITERATURA

1. AKBAR, ALI A PARISSA FARNI, 2012. Morphological Characterization of *Mycobacterium tuberculosis*. In: CARDONA, Pere-Joan, ed. *Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli* [online]. InTech [cit. 2024-06-02]. ISBN 978-953-307-946-2. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/221924952_Morphological_Characterization_of_Mycobacterium_tuberculosis
2. ALSAYED, SHAHINDA S. R. A HENDRA GUNOSEWOYO, 2023. Tuberculosis: Pathogenesis, Current Treatment Regimens and New Drug Targets. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **24**(6) [cit. 2024-06-13]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms24065202>
3. BARBERIS, I., BRAGAZZI, N. L., GALLUZZO, L., & MARTINI, M. (2017). The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of preventive medicine and hygiene* [online]. 2017, 58(1), 9–12 [cit. 2024-05-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432783/>
4. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2024, May 24). tuberculosis [online]. *Encyclopedia Britannica*. [cit. 2024-06-07]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/tuberculosis>
5. CDC, 2024. *Clinical Testing and Diagnosis for Tuberculosis* [online]. [cit. 2024-06-13]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/tb/hcp/testing-diagnosis/index.html>
6. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. 2006 [cit. 2024-06-13]. Dostupné z: <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=8438>
7. CUDAHY, PATRICK A SHEELA V SHENOI, 2016. Diagnostics for pulmonary tuberculosis. *Postgraduate Medical Journal* [online]. 2016-04-01, **92**(1086), 187-193 [cit. 2024-06-13]. ISSN 0032-5473. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4854647/>
8. DOHÁL, MATÚŠ, VĚRA DVOŘÁKOVÁ, MILUŠE ŠPERKOVÁ, et al., 2024. Tuberculosis in Ukrainian War Refugees and Migrants in the Czech Republic and Slovakia: A Molecular Epidemiological Study. *Journal of Epidemiology and Global Health* [online]. **14**(1), 35-44 [cit. 2024-06-02]. ISSN 2210-6014. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11043285/>

9. EBONYI, AUGUSTINE O, STEPHEN OGUCHE, IBRAHIM I ABOK, et al., 2020. Improving the diagnosis of pulmonary tuberculosis using line probe assay and determining the factors associated with the disease in children in Jos, Nigeria. *GERMS* [online]. **10**(4), 328-337 [cit. 2024-06-13]. ISSN 22482997. Dostupné z: <https://doi.org/10.18683/germs.2020.1225>
10. GENEVA: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023. *Global tuberculosis report 2023* [online] [cit. 2024-06-10]. ISBN: 978-92-4-008385-1. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240083851>
11. GILL, CARA M., LORRAINE DOLAN, LAURA M. PIGGOTT A ANNE MARIE MCLAUGHLIN, 2022. New developments in tuberculosis diagnosis and treatment. *Breathe* [online]. 2022-03-07, **18**(1) [cit. 2024-06-13]. ISSN 1810-6838. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8908854/>
12. Geneva: World Health Organization, 2016. *The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis* [online] [cit. 2024-06-13]. ISBN 978 92 4 151118 6. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK384520/pdf/Bookshelf_NBK384520.pdf
13. Geneva: World Health Organization. Line probe assays for detection of drug-resistant tuberculosis: interpretation and reporting manual for laboratory staff and clinicians [online]. 2022, [cit. 2024-06-13]. ISBN 978-92-4-004666-5 Dostupné z: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/354240/9789240046665-eng.pdf?sequence=1>
14. GOPALASWAMY, RADHA, SIVAKUMAR SHANMUGAM, RAJESH MONDAL A SELVAKUMAR SUBBIAN, 2020. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections – a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Biomedical Science* [online]. **27**(1) [cit. 2024-06-13]. ISSN 1423- 0127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00667-6>
15. GÜNTHER, GUNAR, NUNURAI RUSWA A PETER M. KELLER, 2022. Drug-resistant tuberculosis: advances in diagnosis and management. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* [online]. **28**(3), 211-217 [cit. 2024-06-13]. ISSN 1070-5287. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000866>
16. HEEMSKERK, DOROTHEE, MAXINE CAWS, BEN MARAIS A JEREMY FARRAR, 2015. *Tuberculosis in Adults and Children* [online]. Cham: Springer International Publishing [cit. 2024-06-13]. SpringerBriefs in Public Health.

ISBN 978- 3-319-19131-7. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK344402/>

17. HEYCKENDORF, JAN, STEPHEN H. GILLESPIE A MORTEN RUHWALD, 2020. Culture-free proof of *Mycobacterium tuberculosis* - a new assay for viable bacteria. *EBioMedicine* [online]. **62** [cit. 2024-06-13]. ISSN 23523964. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7658474/>
18. HTET, KYAW KO KO, VIRASAKDI CHONGSUWIVATWONG A SI THU AUNG, 2021. Sensitivity and specificity of tuberculosis signs and symptoms screening and adjunct role of social pathology characteristics in predicting bacteriologically confirmed tuberculosis in Myanmar. *Tropical Medicine and Health* [online]. **49**(1) [cit. 2024- 05- 15]. ISSN 1349-4147. Dostupné z:
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7789670/#:~:text=Out%20of%2032%20various%20combinations,%25\)%20and%20specificity%20\(86.3%25](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7789670/#:~:text=Out%20of%2032%20various%20combinations,%25)%20and%20specificity%20(86.3%25)
19. CHOTMONGKOL, Verajit, Seththawut KOSALLAVAT, Kittisak SAWANYAWISUTH, et al., 2024. Evaluation of seegene anyplex MTB/NTM real-time detection assay for diagnosis of tuberculous meningitis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **19**(1) [cit. 2024-06-13]. ISSN 1750-1172. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1186/s13023-023-03009-5>
20. INBARAJ, Leeberk Raja, Jefferson DANIEL, Mukesh Kumar SATHYA NARAYANAN, et al., 2023. TB-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) for diagnosing pulmonary tuberculosis in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. **2023**(9) [cit. 2024-06-13]. ISSN 14651858. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10483929/#CD015806-bbs2-0069>
21. *International Journal of Medical Research Professionals* [online]. [cit. 2024-06-13]. ISSN 24546356. Dostupné z:
https://ijmrp.com/Admin_Portal/Upload/Vol4Issue4/32%20IJMRP%204%284%29%20134-37.pdf
22. KIA, POONEH, UMME RUMAN, ARIYATI RETNO PRATIWI A MOHD ZOBIR HUSSEIN, 2023. Innovative Therapeutic Approaches Based on Nanotechnology for the Treatment and Management of Tuberculosis. *International Journal of Nanomedicine* [online]. **18**, 1159-1191 [cit. 2024-06-13]. ISSN 1178-2013. Dostupné z:
<https://doi.org/10.2147/IJN.S364634>

23. KIM, PETER S A SOUMYA SWAMINATHAN, 2021. Ending TB: the world's oldest pandemic. *Journal of the International AIDS Society* [online]. **24**(3) [cit. 2024-06-13]. ISSN 1758-2652. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jia2.25698>
24. LI, JUNLI, LINGJUN ZHAN A CHUAN QIN, 2021. The double-sided effects of Mycobacterium Bovis bacillus Calmette–Guérin vaccine. *Npj Vaccines* [online]. **6**(1) [cit. 2024-06-13]. ISSN 2059-0105. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00278-0>
25. MASALI, HAJRA TASNEEM, APARNA TAKPERE A PRAVEEN SHAHAPUR, 2021. A Comparative Study of Ziehl-Neelsen Stain and Fluorescent Stain Microscopy in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Pure and Applied Microbiology* [online]. 2021-12-1, **15**(4), 2027-2033 [cit. 2024-06-13]. ISSN 09737510. Dostupné z: <https://microbiologyjournal.org/a-comparative-study-of-ziehl-neelsen-stain-and-fluorescent-stain-microscopy-in-the-diagnosis-of-pulmonary-tuberculosis/>
26. Městská nemocnice Ostrava. *Očkování proti tuberkulóze - Kalmetizace* [online]. [cit. 2024-06-13]. Dostupné z: <https://www.mnof.cz/ockovani-proti-tuberkuloze-kalmetizace>
27. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ REPUBLIKY KAZACHSTÁN, 2023. *V Kazachstánu klesá nemocnost a úmrtnost na tuberkulózu* [online]. [cit. 2024-04-20]. Dostupné z: <https://www.gov.kz/memleket/entities/dsm/press/news/details/605249?lang=ru>
28. M RAMÍREZ-LAPAUSA, A MENÉNDEZ-SALDAÑA Y A NOGUERADO-ASENSIO, 2015. Extrapulmonary tuberculosis: an overview [online]. 17: 3-11 [cit. 2024-04-23]. Dostupné z: https://scielo.isciii.es/pdf/sanipe/v17n1/en_02_revision.pdf
29. NALUNJOGI, JOANITAH, FRANK MUGABE, IRENE NAJJINGO, et al., 2021. Accuracy and Incremental Yield of the Chest X-Ray in Screening for Tuberculosis in Uganda: A Cross-Sectional Study. *Tuberculosis Research and Treatment* [online]. 2021-3-19, **2021**, 1-6 [cit. 2024-06-03]. ISSN 2090-1518. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8004368/>
30. NOVÁKOVÁ T., WALLENFELS J., JARKOVSKÝ J., KAROLYI M., SLEZÁK P., LOULA Z., PANOŠKA P., ŠČAVNICKÝ J., KOMENDA M., DUŠEK L. Interaktivní prohlížeč dat Registru tuberkulózy [online]. Praha: ÚZIS ČR 2024 [cit. 26.05.2024]. Dostupné z: <https://tbc.uzis.cz>

31. Oddělení hygienické a epidemiologické kontroly města Almaty, 2021. *11 povinných očkování v Kazachstánu* [online]. [cit. 2024-06-13]. Dostupné z: <https://www.gov.kz/memleket/entities/departament-kkbtu-almaty/press/news/details/161089?lang=ru>
32. PAGADUAN, JAYSON V. A GHAITH ALTAWALLBEH, 2023. Advances in TB testing. In: *Advances In Clinical Chemistry* [online]. Elsevier, s. 33-62 [cit. 2024-06-13]. *Advances in Clinical Chemistry*. ISBN 9780443192906. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10056534/>
33. PAI, MADHUKAR, CLAUDIA M. DENKINGER, SANDRA V. KIK, et al., 2014. Gamma Interferon Release Assays for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **27**(1), 3-20 [cit. 2024-06-13]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-13>
34. P.J BRENNAN, Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis* [online]. 2003, **83**(1-3), 91-97 [cit. 2024-06-07]. ISSN 1472- 9792, Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00089-6)
35. PROMSENA, PATHARIYA, WATSAMON JANTARABENJAKUL, PIYARAT SUNTARATTIWONG, et al., 2022. Diagnostic Accuracy of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for Tuberculosis in Children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* [online]. 2022-01-01, **11**(1), 9-15 [cit. 2024- 06- 13]. ISSN 2048-7207. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jpids/piab097>
36. RAHLWES, KATHRYN C., BEATRIZ R.S. DIAS, PRISCILA C. CAMPOS, SAMUEL ALVAREZ-ARGUEDAS A MICHAEL U. SHILOH, 2023. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence* [online]. 2023-12-31, **14**(1) [cit. 2024-04-19]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9817126/>
37. RAMÍREZ-LAPAUSA, M., A. MENÉNDEZ-SALDAÑA a A. NOGUERADO-ASENSIO, 2015. Tuberculosis extrapulmonar, una revisión. *Revista Española de Sanidad Penitenciaria* [online]. **17**(1), 3-11 [cit. 2024-06-13]. ISSN 1575-0620. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.4321/S1575-06202015000100002>
38. RICCARDI, N., CANETTI, D., MARTINI, M., DIAW, M. M., DI BIAGIO, A., CODECASA, L., BARBERIS, I., BRAGAZZI, N. L., & BESOZZI, G. The evolution of a neglected disease: tuberculosis discoveries in the centuries. *Journal of preventive*

- medicine and hygiene* [online]. 2020, 61(1), 9–12 [cit. 2024-05-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.1s1.1353>
39. RODRIGUEZ-TAKEUCHI, SARA YUKIE, MARTIN EDUARDO RENJIFO A FRANCISCO JOSÉ MEDINA, 2019. Extrapulmonary Tuberculosis: Pathophysiology and Imaging Findings. *RadioGraphics* [online]. 39(7), 2023-2037 [cit. 2024-06-13]. ISSN 0271-5333. Dostupné z: <https://doi.org/10.1148/rg.2019190109>
40. SALI, MICHELA, FLAVIO DE MAIO, FRANCESCA CACCURI, et al., 2016. Multicenter Evaluation of Anyplex Plus MTB/NTM MDR-TB Assay for Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Multidrug-Resistant Isolates in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 54(1), 59-63 [cit. 2024-06-13]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.01904-15>
41. SEUNG, KWONJUNE J., SALMAAN KESHAVJEE A MICHAEL L. RICH, 2015. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2015-09-01, 5(9) [cit. 2024-06-13]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4561400/>
42. SHAIN, CHLOË-SARAH, 2018. "They are my babies": Meeting *Mycobacterium tuberculosis* and the Scientists Who Care for It. *Journal for Undergraduate Ethnography* [online]. 2018-04-03, 7(2) [cit. 2024-06-13]. ISSN 2369-8721. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/%22They-are-my-babies%22%3A-Meeting-Mycobacterium-and-the-Shain/41a331186292fccc34ddc1898f770e7242e9a8a9>
43. SINGH, VARINDER A SUSHIL K. KABRA, 2019. Advances in Tuberculosis: Diagnostics. *The Indian Journal of Pediatrics* [online]. 86(5), 439-440 [cit. 2024-06-13]. ISSN 0019-5456. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12098-019-02942-3>
44. SUÁREZ, ISABELLE, SARAH MARIA FÜNGER, STEFAN KRÖGER, JESSICA RADEMACHER, GERD FÄTKENHEUER A JAN RYBNIKER, 2019. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Deutsches Ärzteblatt international* [online]. [cit. 2024-06-13]. ISSN 1866-0452. Dostupné z: <https://www.aerzteblatt.de/int/archive/article/210460>
45. THOMAS M. DANIEL, The history of tuberculosis, *Respiratory Medicine*, 2006, 100(11), 1862-1870. ISSN 0954-6111. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095461110600401X?via%3Dihub>

46. TOTH A, FACKELMANN J, PIGOTT W, TOLOMEO O. Tuberculosis prevention and treatment. *Can Nurse* [online]. 2004; **100**(9): 27-30 [cit. 2024-06-13]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15623010/>
47. VENKATAPPA, THARA K., ROSE PUNNOOSE, DOLLY J. KATZ, et al., 2019. Comparing QuantiFERON-TB Gold Plus with Other Tests To Diagnose *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **57**(11), e00985-19 [cit. 2024-06-13]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jcm.00985-19>
48. WANG, LUQI, JINGHUI YANG, LIANG CHEN, WEIBING WANG, FANGYOU YU A HAIYAN XIONG, 2022. Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for prediction of drug resistance. *Epidemiology and Infection* [online]. **150** [cit. 2024-06-13]. ISSN 0950-2688. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S095026882100279X>
49. WILCZEK, NATALIA ANNA, ANNA BRZYSKA, JULIA BOGUĆKA, WIKTORIA EWA SIELWANOWSKA, MONIKA ŻYBOWSKA, HALINA PIECEWICZ-SZCZĘSNA A AGATA SMOLEŃ, 2023. The Impact of the War in Ukraine on the Epidemiological Situation of Tuberculosis in Europe. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **12**(20) [cit. 2024-05-11]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10607046/>
50. World Health Organization and the European Centre for Disease Prevention and Control, 2023. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe [online] [cit. 2024-06-13]. ISSN 2443-5538 Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/tuberculosis-surveillance-monitoring-2023.pdf>
51. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Chest radiography in tuberculosis detection* [online], 2016. 1-44 [cit. 2024-04-23]. ISBN 978 92 4 151150 6. Dostupné z: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/252424/?sequence=1>
52. ZAPOROJAN, NATALIA, RODICA ANAMARIA NEGREAN, RAMONA HODIŞAN, CLAUDIU ZAPOROJAN, ANDREI CSEP A DANA CARMEN ZAHA, 2024. Evolution of Laboratory Diagnosis of Tuberculosis. *Clinics and Practice* [online]. **14**(2), 388-416 [cit. 2024-06-13]. ISSN 2039-7283. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/clinpract14020030>
53. ZHANG, YU, GUOZHONG ZHOU, WEI SHI, et al., 2023. Comparing the diagnostic performance of QuantiFERON-TB Gold Plus with QFT-GIT, T-SPOT.TB and TST: a

systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* [online]. **23**(1) [cit. 2024-03-13]. ISSN 1471-2334. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08008-2>