

	Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP	NSVP_6
Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

# NÁRODNÍ STANDARDNÍ VYŠETŘOVACÍ POSTUP

## NSVP\_7

-

# ZÁKLADNÍ MIKROBIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA MYKOBAKTERIÁLNÍCH ONEMOCNĚNÍ

Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP

Vypracoval	Kontroloval	Schválil
Skupina autorů		

**Skupina autorů:**

MUDr. Jana Amlerová

Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.

MUDr. Jana Svobodová

MGr. Vít Ulmann

MUDr. Ilona Zemanová

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 1/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

### Rozdělovník

Výtisk č.	Umístění	Odpovědná osoba	Podpis
1	Elektronická forma – WEB SLM ČLS JEP	Eva Mrázková	

### Revize

Číslo revize	Datum revize	Odpovědná osoba	Podpis
1			
2			
3			
4			
5			

### Schvalovací proces

Číslo revize	Datum revize	Postup	Odpovědná osoba	Připomínky
1	3.12.2014	Seminář SLM	Čermák, P.	Pavel.cermak@ftn. cz
2		Web SLM ČLS JEP	Scharfen, J.	
3		Platné od		
4				
5				

### Obsah

Úvod

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 2/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

<b>Vysvětlivky, technické informace, limity metod.....</b>	<b>13</b>
<b>1.Odběr vzorků, přeprava, skladování.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. Bezpečnostní opatření 72-78.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Optimalizace podmínek.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3. Správný druh vzorku a metody odběru.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4. Dostatečné množství vzorku a vhodný počet vzorků.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5. Transport.....</b>	<b>19</b>
<b>2.Zpracování vzorků v mikrobiologické laboratoři.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Posouzení bezpečnosti 72-78.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Standardní minimum.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3. Mikroskopie69,70.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4. Dekontaminace a homogenizace vzorků biologického materiálu .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5. Průkaz nukleových kyselin – amplifikační testy.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6. Kultivace.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Identifikace.....</b>	<b>34</b>
<b>4. Testování citlivosti.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Stanovení citlivosti komplexu Mycobacterium tuberculosis.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2. Stanovení citlivosti u netuberkulózních, tj. podmíněně patogenních, mykobakterií (NTM).....</b>	<b>38</b>
<b>4.3. Využití referenční laboratoře nebo jiné laboratoře prokazatelně akreditované a opakovaně úspěšné v EHK.....</b>	<b>38</b>
<b>5. Hlášení výsledků.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1. Mikroskopie .....</b>	<b>39</b>
<b>5.2. Kultivace .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3. Testování citlivosti .....</b>	<b>40</b>
<b>6. Povinné hlášení pozitivních výsledků.....</b>	<b>40</b>
6 Hlášení	
7 Materiální, technické a personální zabezpečení	
8. Systém kontroly jakosti	
9. Validace a verifikace	
10. související dokumentace	
11. Literatura	
12. Definice, terminologie a zkratky	
13. Rozdělovník	
14. Související záznamy	
15. Přílohy	

**NÁZEV: NSVP\_7 Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění**

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 3/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

### Účel vyšetření

Národní standard byl vytvořen pro detekci a izolaci mykobakterií z různých typů klinických vzorků. Pro větší záchyt mykobakterií je doporučováno použití automatického systému kultivace v tekuté půdě v kombinaci s pevnými půdami. Pro laboratorní diagnostiku tuberkulózy a onemocnění způsobených netuberkulózními mykobakteriemi je nejefektivnější kombinace fenotypických a genetických metod.

Klinická diagnostika, prevence a kontrola TBC nejsou součástí tohoto dokumentu.

Tento dokument by měl být používána spolu s ostatními národními standardními postupy.

### Typa vzorků

Sputum

Jiný respirační materiál

Laryngeální výtěr

Moč

Pleurální punktát

Likvor

Uzlina lymfatická

Kůže

Žaludeční výplach

Stolice, výplach střeva

Jiný materiál – punktát jiný než pleurální, výtěry a stěry, tkáň – bioptický a nekroptický materiál vč. gynekologického, kosti, kostní dřeně

Krev - (Pozn. Krev není ve většině případů vhodný vzorek pro vyšetření na mykobakterie (ani na klasickou kultivaci a mikroskopii ani na PCR)! V rutinních mykobakteriologických laboratořích se hemokultivace neprovádí. Vyšetření krve je tak prakticky omezeno na IGRA testy – viz níže)

Preferuje se tekutý vzorek před výtěry, stěry z ložiska. Je-li odběr na tampon nezbytný, doporučuje se odběr na minimálně dva tampony zvlhčené SDV nebo FR, popřípadě jejich zanoření do nádoby s 1-2 ml SDV nebo FR.

### Úvod

Tuberkulóza (TBC) patří mezi nejstarší známá onemocnění a po řadu století sužovala zejména evropské národy. Jedním z největších úspěchů moderní medicíny bylo zavedení očkování a účinné terapie. Společně s dalšími faktory, jako jsou systém zdravotní péče a epidemiologický dohled nad výskytem a šířením nemoci, došlo ve dvacátém století k podstatnému snížení výskytu tuberkulózy. Tento pokles již není v posledních letech tak výrazný. TBC však stále představuje nebezpečí a může vyvolávat lokální vzplanutí

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 4/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

onemocnění. Výskyt TBC v populaci je nerovnoměrný. Některé skupiny obyvatelstva (etnické a sociální) mají podstatně vyšší výskyt TBC. Ve světě se nachází řada zemí s velmi vysokou prevalencí tohoto onemocnění zejména tam, kde je nižší sociálně-ekonomická úroveň. V těchto oblastech zároveň dochází ke vzniku a následnému šíření rezistentních kmenů. Z celosvětového hlediska představuje TBC zásadní problém. Z těchto důvodů je nutné problematice TBC věnovat pozornost. Také proto vzniká Národní vyšetřovací postup pro diagnostiku mykobakteriálních onemocnění.

TBC je způsobena mykobakteriemi skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex (MTBC). U lidí převažuje *M. tuberculosis*, ostatní členové skupiny MTBC *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii* a *Mycobacterium caprae* jsou vzácné. Vakcinační kmen *Mycobacterium bovis* BCG, používaný rovněž pro terapii karcinomu močového měchýře, může být příčinou onemocnění u imunokompromitovaných pacientů. *Mycobacterium microti* a *Mycobacterium pinnipedii* jsou výlučně spojovány s infekcemi jiných savců a jen výjimečně mohou způsobit infekci imunokompromitovaných pacientů<sup>3-5</sup>.

Inkubační doba TB onemocnění může být měsíce až roky. Latentní tuberkulózní infekcí (LTBI) se nazývá stav, kdy pacient má pozitivní kožní nebo krevní test prokazující aktivaci imunitního systému, ale nemá symptomy aktivního onemocnění<sup>1</sup>. Tuberkulóza postihuje nejčastěji plíce, může ale napadnout jakýkoliv tělesný orgán. Charakteristickým morfologickým projevem tuberkulózy jsou granulomy.

Počáteční infekce pacienta s MTBC organizmy se nazývá primární tuberkulóza. V případě primární tuberkulózy vznikají léze v místě vstupu mykobakterií do organismu. Nejčastěji jsou to plíce, ale mohou to být také tonzily, střevo nebo kůže. V tomto stádiu jsou rovněž infikovány mízní uzliny (primární komplex). Tuberkulinový test je pozitivní 3 - 6 týdnů po infekci a je známkou rozvoje buněčné imunity a tkáňové přecitlivělosti. Ložiska zasahující endotel krevních cév mohou prasknout a způsobit diseminaci nebo miliární TBC.

Postprimární tuberkulóza vzniká aktivací mykobakterií v primárním komplexu nebo exogenní reinfekcí. Rozvíjí se obvykle 5 a více let po primární infekci a postihuje spíše dospělé než děti. Infekce *M. tuberculosis* progreduje v klinické onemocnění pouze v malém počtu případů. Predisponujícím faktorem může být nedostatek vitamínu D<sup>6-7</sup> popřípadě další vlivy jako např. imunosuprese nebo vrozená vnímavost podmíněná přítomností specifických genů<sup>8</sup>.

Stěna mykobakterií obsahuje mykolové kyseliny, které patří mezi mastné kyseliny s dlouhými řetězci. Způsobují, že se mykobakterie nebarví běžnými postupy a k proniknutí barviva do buňky jsou nutné speciální procedury (např. použití tepla, detergentů). Jestliže jednou barvivo přijmou, není možné jej následně odstranit běžnými kyselými alkoholovými rozpouštědly. Proto jsou označovány jako acidorezistentní<sup>1,2,9,10</sup>. Tato barvicí charakteristika je velmi důležitá pro mikrobiologickou a histologickou diagnostiku mykobakteriálních onemocnění.

## ***Mycobacterium tuberculosis***

### **Plicní tuberkulóza**

Infekce vzniká vdechnutím kapénkové částice obsahující původce tuberkulózy. Mikroorganismus je v místě vniknutí pohlcen fagocytujícími buňkami, ve kterých nejenom přežívá, ale může se i množit. Z tohoto primárního ložiska se šíří lymfatickými cestami

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 5/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

do mízních uzlin. Pokud se dostane do krevního řečiště, infikuje plíce a další orgány. U většiny pacientů vznikají granulomatózní ložiska obsahující živé mykobakterie. Rozvoj onemocnění podporují faktory jako je imunosuprese, alkoholismus a malnutrice.

Základní postup diagnostiky plicní tuberkulózy zahrnuje klinické vyšetření pacienta a laboratorní vyšetření adekvátního materiálu. Diagnóza plicní tuberkulózy může být primárně potvrzena již na základě odpovídajících klinických příznaků a nálezu na skiagramu hrudníku v kombinaci s přihlédnutím k výsledku mikroskopického vyšetření sputa. Zahájení terapie antituberkulotiky je možné už na základě klinických zjištění bez ohledu na negativní výsledek mikroskopického nebo molekulárně biologického vyšetření a zároveň ještě před tím, než je znám výsledek kultivace.

Výskyt rezistentních forem MTBC umocňuje význam odběru adekvátních vzorků pro kultivaci a stanovení *in vitro* citlivosti izolovaného kmene *M. tuberculosis* a provedení genotypizace pro epidemiologické účely také z materiálů získaných při pitvě<sup>1,10,13</sup>. Běžně se odebírají tři vzorky sputa pro mikroskopické a kultivační vyšetření<sup>1,2,4,9,12,14</sup>.

## **Mimoplicní tuberkulóza**

### **Lymfadenitis**

Lymfadenitis je v současnosti v ČR nejčastější formou mimoplicní tuberkulózní infekce. Cervikofaciální lymfadenitidu mohou u dětí způsobit také netuberkulózní mykobakterie, zejména *Mycobacterium avium*<sup>15-19</sup>.

### **Miliární tuberkulóza**

Tímto termínem byl dříve označován rozsev infekčních lézí na tisíce ložisek. Nyní se takto označuje forma progresivně diseminované hematogenní tuberkulózy<sup>20</sup>. Incidence případů miliární TBC koreluje s nárůstem počtu imunokompromitovaných pacientů s HIV infekcí.

### **Neurotuberkulóza – tuberkulózní meningitida**

Tuberkulózní meningitida je většinou způsobena hematogenním rozsevem, nebo provalením subependimálního tuberkulomu do subarachnoidálního prostoru. Klinické příznaky obvykle začínají závratěmi, intermitentní bolestí hlavy a mírnou horečkou. Po 2-3 týdnech následují protrahované bolesti hlavy, zvracení, meningeální a fokální neurologické příznaky<sup>20</sup>. Největší mortalita je u malých dětí a starších pacientů a v případech, kdy příznaky onemocnění trvaly déle než dva měsíce. Diagnóza se odvíjí hlavně od klinických příznaků. Typickým nálezem v likvoru jsou bílé krvinky s převahou lymfocytů. Bílé krvinky ale mohou chybět, v některých případech mohou dokonce převažovat polymorfonukleární leukocyty. Proteiny jsou obvykle zvýšeny. Diagnostické algoritmy jsou v případě podezření na tuberkulózní meningitidu zaměřeny na rychlou diagnostiku<sup>21</sup>. Pravděpodobnost pozitivních výsledků mikroskopie a kultivace se zvyšuje odebráním velkého množství likvoru (>6 ml) nebo jeho opakovanými odběry<sup>21</sup>. Léčba tuberkulózní meningitidy, vzhledem k závažnosti postižení, má být zahájena již na základě klinických příznaků a jiných laboratorních nálezů bez ohledu na negativní výsledek amplifikačních testů, nebo mikroskopie.

### **Gastrointestinální TBC**

Gastrointestinální tuberkulóza způsobená *M. bovis* byla dříve častá po konzumaci nepasterizovaného mléka. Pokud je tato forma mimoplicní tuberkulózy vyvolána

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 6/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

*M. tuberculosis*, vzniká zpravidla spolknutím infekčního sekretu z plic<sup>22</sup>. V současnosti, v době účinné antituberkulotické léčby, je tuberkulóza v této lokalizaci vzácná.

Diagnostikuje se endoskopicky. Mikroskopické i kulturační vyšetření bývá pozitivní<sup>1</sup>.

### **Peritoneální TBC**

Peritoneální tuberkulóza může být v ascitické (exsudativní) nebo v adhezivní (suché) formě. Ascitická forma je charakterizovaná přítomností volné tekutiny, adhezivní forma fibrozními adhezemi. Častější bývá forma exsudativní, která se projevuje zvětšujícím se břišním objemem<sup>23</sup>.

### **Urogenitální TBC**

Urogenitální tuberkulóza se častěji vyskytuje u mužů a jen vzácně před pubertou. Interval mezi infekcí a manifestací renálního onemocnění je obvykle velmi dlouhý (roky nebo desetiletí). Při onemocnění mohou vznikat kazeózní ložiska, ze kterých se uvolňují mykobakterie do ledvinových pánviček a ureterů a infekce se může šířit do močového měchýře<sup>25</sup>. Projevuje se častým močením doprovázeným dysurií a hematurií. V moči bývají přítomny bílkoviny a krev (více než 50 % případů), častá je sterilní pyurie (více než 80 % případů)<sup>10,24-26</sup>.

### **Tuberkulóza kostí a páteře**

Tuberkulóza kostí a páteře je výsledkem hematogenního šíření z primární plicní infekce<sup>27</sup>. Predisponujícími faktory jsou snížená imunita a intravenózní aplikace drog. Nejčastější manifestací je tuberkulóza páteře, následuje postižení velkých kloubů, jako jsou kolena a kyčle. Diagnóza je obvykle stanovena na základě klinických příznaků, rentgenového vyšetření, mikroskopického a kulturačního vyšetření bioptického vzorku nejčastěji z dolní hrudní nebo horní bederní oblasti<sup>28</sup>. Postihuje nejčastěji starší děti a mladé dospělé. Způsobuje zhroucení obratlů s následnou deformací páteře. Tuberkulózní absces psoatu vzniká na základě onemocnění hrudní nebo bederní páteře, šířícího se uvnitř vazivového pouzdra psoatu, někdy velmi daleko.

### **Bakteriémie**

Mykobakterie často způsobují lehkou bakteriémii, která je u infikovaného jedince přirozená a která přispívá k rozšíření TBC do dalších orgánů<sup>29</sup>. Detekovatelná mykobakteriémie je přesto poměrně vzácná. Výjimkou jsou výrazně imunokompromitovaní pacienti (zejm. s HIV-AIDS)<sup>30-33</sup>. U pacientů s AIDS z rozvinutých zemí převažuje *Mycobacterium avium* komplex, u pacientů ze Subsaharské Afriky pak MTBC<sup>32-34</sup>. Výskyt těchto krví šířících se mykobakteriálních infekcí je nyní, v době dostupné antiretrovirové terapie, mnohem menší<sup>35</sup>. Mykobakterie byly izolovány z krve i u jinak imunokompromitovaných pacientů (např. s leukémií), občas dokonce i u pacientů, kteří sníženou imunitu nemají<sup>30</sup>.

### **Multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB)**

V posledních letech jsou z celého světa stále častěji hlášeny případy tuberkulózy odolné vůči jednomu nebo více antituberkulotikům<sup>36,37</sup>. *M. tuberculosis* se stává vůči antituberkulotikům odolným spontánně náhodnou mutací<sup>38</sup>. Faktory spojované s lékovou rezistencí zahrnují nedokončenou a nesprávnou léčbu a nedodržení předepsané doby léčby. Primární rezistence je definována jako rezistence kmene, kterým se nakazí pacient bez předchozí antituberkulózní léčby delší než 1 měsíc. K sekundární rezistenci dochází, když se

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 7/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

rezistentní mutanty objeví u původně citlivého kmene v průběhu infekce, většinou z důvodu nesprávné antituberkulózní léčby. Multirezistentní tuberkulózní kmeny (MDR-TB) jsou *in vitro* rezistentní současně vůči isoniazidu a rifampicinu. Kromě konvenčních fenotypových metod testování citlivosti může být genová mutace, která je spojovaná s rezistencí, zjišťována také různými molekulárními metodami. Takové metody mohou být použity buď na izolátu, nebo přímo na vzorku; zjišťování rezistence přímo ze vzorku poskytne rychlejší výsledek při zjišťování lékové citlivosti. Léčebné režimy MDR-TB bývají méně efektivní a časově delší než u citlivé TBC. Stále častěji se objevují kmeny tuberkulózy extrémně rezistentní (XDR-TB). Tyto organizmy kromě toho, že jsou multirezistentní (MDR), jsou navíc odolné vůči jakémukoliv fluorochinolonu a současně alespoň vůči jednomu injekčně aplikovatelnému léku „druhé řady“, jmenovitě amikacinu, kanamycinu nebo capreomycinu<sup>39</sup>. Byly již hlášeny i případy totálně (zcela) rezistentní tuberkulózy (TDR-TB)<sup>40</sup>.

## Netuberkulózní mykobakterie (NTM)

Tyto mykobakteriální druhy jsou nazývány různě: „netuberkulózní mykobakterie (NTM)“, „mykobakterie z prostředí (environmentální)“, „neznámé (anonymní) mykobakterie“, „atypické mykobakterie“ a „příležitostně patogenní (oportunní) mykobakterie“. NTM jsou v přírodě všudypřítomné, vyznačují se různým stupněm patogenity pro člověka. Počet infekcí způsobených netuberkulózními mykobakteriemi (NTM) se neustále zvyšuje. Infekce je environmentálního původu. Zdrojem je nejčastěji voda, rostlinný a živočišný materiál (tkáně a exkrementy infikovaných obratlovců). Počet buněk mykobakterií nutný k infekci a rozvoji onemocnění člověka je závislý na stupni predispozice jedince, obecně je však u většiny druhů NTM velmi vysoký. Předpokladem k infekci je tedy značná kontaminace zdroje a/nebo opakovaný, dlouhodobý kontakt s ním. Infikovaný po expozici nemusí vždy onemocnět. Z výše uvedených důvodů je rovněž interhumánní přenos mykobakterií takřka vyloučený (velmi nepravděpodobný) a dosud také nebyl přesvědčivě dokumentován. Důvodem narůstajícího výskytu a významu mykobakterií je nejen zvyšující se prevalence predisponujících faktorů v populaci, ale také přizpůsobivost mykobakterií při osidlování nových substrátů.

NTM jsou často rezistentní vůči klasickým antituberkulotikům<sup>41,42</sup>. Korelace mezi *in vitro* rezistencí a *in vivo* účinností však zůstává mnohem méně definovaná pro NTM než pro MTBC<sup>41</sup>. Koncem roku 2013 bylo popsáno 165 mykobakteriálních druhů a 13 poddruhů, z nichž některé jsou již uznávány jako obligátní (vždy nemoc způsobující) a mnohé jako oportunní (příležitostné) patogeny lidí a zvířat<sup>41,43</sup>. Izolace NTM ze vzorků jako je sputum se, na rozdíl od *M. tuberculosis*, nerovná nemoci. Mikrobiologické výsledky musí být interpretovány ve spojení s klinickými a dalšími nálezy (radiologickými apod.)<sup>41</sup>. Taxonomie skupiny NTM se průběžně mění a rozvíjí díky novým technologiím jako je 16S rRNA sekvenování<sup>43</sup>. Tradiční rozdělení na „rychle rostoucí“ a „pomalu rostoucí“ druhy na základě schopnosti kmenů vytvořit jasně viditelné kolonie v subkultuře na pevné půdě po 7 či méně dnech inkubace v současnosti již postrádá klinický a taxonomický význam<sup>41,43</sup>.

Diagnostika a terapie NTM se řídí níže uvedenými kritérii České pneumologické a ftizeologické společnosti, obsaženými v Doporučeném postupu pro diagnostiku a léčbu mykobakterií dospělých:

### Diagnostické trias:

Klinický nález, rentgenový obraz a pozitivní kultivační průkaz NTM a/nebo histopatologický nález granulomatózního zánětu z biopsie infikované tkáně.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 8/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

#### Bakteriologické vyšetření - rozhodující

- dvě a více pozitivních kultivací NTM ze separátních vzorků sputa
- jedna a více pozitivních kultivací z bronchiálního výplachu nebo laváže
- transbronchiální nebo plicní či jiná biopsie s průkazem granulomatózního zánětu, acidorezistentních tyček a pozitivní kultivace NTM
- histologický průkaz granulomatózního zánětu a jedna či více pozitivních kultivací NTM ze sputa nebo bronchiálního výplachu.

#### ***Mycobacterium avium-intracellulare* komplex (MAIC)**

Termín *M. avium-intracellulare* komplex se v klinické mikrobiologii často používá pro zjednodušení a označuje kmeny fenotypově se podobající *M. avium*<sup>42</sup>. Existují tři validně popsané poddruhy druhu *M. avium*: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* a *M. avium* subsp. *silvaticum*<sup>41,43,44</sup>. U imunokompetentních pacientů mohou MAIC organizmy, většinou *M. intracellulare*, napadnout bronchiální strom. Dochází k tomu především na predisponovaných místech, jako jsou bronchiektázie nebo staré kavitace (dutiny)<sup>41</sup>. U imunosuprimovaných pacientů mohou *M. avium* a příbuzné mikroorganismy způsobit i diseminované infekce<sup>35,41</sup>. *M. avium* může způsobit také krční lymfadenitidu u malých dětí<sup>18,19,41</sup>. Tyto mikroorganismy jsou často přítomny ve vodě a mohou kontaminovat vzorky.

#### ***Mycobacterium gordonae***

*M. gordonae* se běžně vyskytuje ve vodě a jen zřídka a diskutabilně způsobuje onemocnění u pacientů se sníženou imunitou<sup>41</sup>. Představuje běžnou kontaminantu klinických vzorků.

#### ***Mycobacterium kansasii***

*M. kansasii* nejčastěji způsobuje plicní infekce, zejm. u pacientů s již existujícím chronickým onemocněním plic (např. s pneumokoniózou). Může však postihnout jakoukoli část těla<sup>41</sup>. Je to fotochromogenní druh, tzn., že k vytvoření pigmentace (žlutého zbarvení) kolonií potřebuje světlo.

#### ***Mycobacterium malmoensae***

*M. malmoensae* nejčastěji napadá plíce a lymfatické uzliny. Byly ale hlášeny i diseminace a mimoplicní nemoci<sup>41</sup>. Diagnostika *M. malmoensae* je stejná jako u ostatních mykobakterií, ale kultivace trvá obvykle déle - na pevných půdách začínají být kolonie viditelné až za 12 týdnů<sup>45</sup>.

#### ***Mycobacterium marinum***

*M. marinum* způsobuje tzv. granulomy akvaristů („fish tank granuloma“) a granulomy plaveckých bazénů („swimming pool granuloma“). Jde o lokalizované kožní léze. Vznikají tak, že se do otevřené rány nebo oděrky dostane voda kontaminovaná druhem *M. marinum* z akvárií, bazénů nebo přírodních sladkých i slaných vod. Tento druh roste středně rychle, optimální růstová teplota je 28-30 °C<sup>41</sup>.

#### ***Mycobacterium ulcerans***

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 9/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

*M. ulcerans* se vyskytuje na různých místech světa - v Austrálii („Bairnsdale ulcer“ - Bairnsdalský vřed), jihovýchodní Asii, v Ugandě i ostatních částech Afriky („Buruli ulcer“ - Burulský vřed), ve střední a jižní Americe<sup>41,46</sup>. Způsobuje kožní léze, infekce může vést k chronickým progresivním nebolestivým vředům, které se občas mohou objevit u cestovatelů z endemických oblastí<sup>41,46</sup>. Tento mikroorganismus může být v laboratoři obtížně izolovatelný, protože je citlivější ke standardním dekontaminačním metodám než jiné mykobakteriální druhy. Roste pomalu (6-12 týdnů) a vyžaduje inkubaci při 30-33 °C<sup>41,46</sup>. Molekulární metody mohou být přínosem pro potvrzení klinické diagnózy.

### ***Mycobacterium xenopi***

*M. xenopi* je dalším poměrně běžným původcem plicních mykobakterióz (netuberkulózního plicního mykobakteriálního onemocnění) v určitých zeměpisných oblastech<sup>41,47</sup>. Je termofilní, s optimální růstovou teplotou 45 °C. Podobně jako *M. malmoense* roste pomalu při teplotě 37 °C. Může být izolováno z různých přírodních zdrojů, vč. vodovodních kohoutků s teplou vodou. Je možnou příčinou kontaminace vzorku<sup>41</sup>.

### **Kultivačně náročné druhy**

Určité mykobakteriální druhy vyžadují specifické suplementy nebo podmínky, aby vůbec mohly být v laboratoři úspěšně vykultivovány. Patří sem ***Mycobacterium genavense*** (využívá mycobactin J) a ***Mycobacterium haemophilum*** (vyžaduje hemin nebo jiné směsi obsahující železo). U obou druhů bylo prokázáno, že se vyskytují převážně u pacientů se sníženou imunitou vč. těch, kteří jsou infikováni HIV<sup>41</sup>. Nicméně *M. haemophilum*, které má optimální růstovou teplotu 28-30 °C, může způsobit lymfadenitidu u jinak zdravých dětí<sup>19,41</sup>. ***Mycobacterium leprae***, původce lepry, nelze v současnosti *in vitro* vykultivovat.

### ***Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae, Mycobacterium fortuitum***

Tyto a jim příbuzné druhy jsou známé jako původci infekcí kůže a měkkých tkání<sup>41,48</sup>. Mohou způsobovat také prostetické infekce (infekce vznikající v souvislosti s cizorodým materiálem v těle – obvykle jde o dlouhodobě zavedené cévní, močové, dialyzační katetry, drény, kanyly, implantáty a protézy)<sup>41</sup>. Tyto mikroorganismy byly nalezeny i v bronchoalveolární laváži a někdy mohou být příčinou falešně pozitivní diagnózy. Ačkoli byly nalezeny různé variace některých poddruhů, jejich optimální růstová teplota leží mezi 30-33 °C. Tyto druhy mohou být přítomny jako kolonizace dýchacích cest zejm. u pacientů s primárně změněnými dýchacími cestami plicní chorobou (např. cystickou fibrózou).

## **Mykobakterie a HIV/AIDS**

Odhaduje se, že třetina všech celosvětově HIV infikovaných lidí je současně infikována druhem *M. tuberculosis*<sup>49</sup>. Chudoba, přelidnění a bezdomovectví jsou společné sociálně ekonomické faktory podporující šíření TBC i HIV<sup>50</sup>. Pacienti nakažení HIV jsou náchylní k reaktivaci latentní tuberkulózní infekce a také k rychlému zhoršení nedávno získaných infekcí<sup>51</sup>. U pacientů se souběžnými nemocemi (koinfekcemi) je potřeba diagnostiku a léčbu koordinovat<sup>52</sup>.

Různé druhy netuberkulózních mykobakterií, nejčastěji MAIC, byly izolovány ze systémových infekcí u HIV pozitivních pacientů. Výskyt takových diseminovaných infekcí byl však výrazně snížen zavedením vysoce účinné antiretrovirové terapie<sup>35,41</sup>.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 10/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

## Automatické metabolické kultivační systémy

Metabolické kultivační systémy jsou doporučeny, a všeobecně již zavedeny, pro rychlou detekci růstu mykobakterií. Princip detekce růstu spočívá v kontinuálním monitorování spotřeby kyslíku a/nebo produkce CO<sub>2</sub>. Metabolický princip detekce růstu v tekutých médiích je prokazatelně rychlejší oproti hodnocení růstu na pevných půdách<sup>81,82</sup>, proto jej vhodně doplňují<sup>2,10,41,83</sup>. Některé kmeny je možné zachytit pouze na pevných vaječných médiích, jako je např. Löwenstein-Jensenova nebo Ogawova půda<sup>10</sup>. Kultivace na pevných médiích je rovněž výhodná pro ty typy vzorků, které je nutné kultivovat při jiné teplotě než 37 °C (například kožní biopsie).

Metabolické kultivační systémy se s výhodou využívají také pro testování lékové citlivosti, kdy výsledek může být dostupný již 4-12 dnů po inokulaci.

## Molekulárně biologické metody detekce DNA, RNA *M. tuberculosis* a typizace mykobakterií

Využití genetických metod přímé detekce *M. tuberculosis* ve vzorku biologického materiálu může být v jistých případech velmi přínosné (např. rychlé potvrzení tuberkulózní meningitidy)<sup>21,56</sup>. Vysoké spolehlivosti a přesnosti výsledku amplifikačních metod bývá dosaženo především při vyšetření biologického materiálu z respiračních cest. Vyšetření ostatních typů materiálů je limitováno nižší citlivostí molekulárně biologických metod. Pozitivní výsledek vyšetření jakéhokoliv vzorku může v kontextu klinických nálezů s vysokou spolehlivostí (pozor na mrtvé mykobakterie – např. z BAL či po léčbě\*) podpořit diagnózu tuberkulózy (Vyhláška č. 233/2011 Sb. o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce). Na základě negativního výsledku amplifikačních metod však nelze onemocnění definitivně vyločit. Proto je nutné vyšetřit vzorek (nebo alikvotu) pacienta také mikroskopicky a kultivačně<sup>2,9,21</sup>.

\*Zcela vyloučeno je využití genetických metod při vyšetřování vzorků již léčených pacientů jako nástroje pro monitoring úspěšnosti léčby, eventuelně pro vyloučení recidivy u dříve léčených pacientů. V tomto ohledu zůstává kultivace rozhodujícím vyšetřením!

Pokrok ve vývoji molekulárně biologických metod nicméně přináší výrazné zlepšení parametrů diagnostických souprav. Poslední mezinárodní studie potvrdily až 98% citlivost při vyšetření mikroskopicky pozitivních vzorků sputa a 73% citlivost u vzorků negativních. Na základě těchto zjištění vydala WHO soubor doporučení, shrnujících využití metod při diagnostice tuberkulózy. Jedním ze stěžejních bodů je zařazení amplifikačního vyšetření jako jednoho z iniciačních testů pro potvrzení tuberkulózy u pacientů s podezřením na HIV infekci spojenou s aktivní tuberkulózou, popřípadě u pacientů s podezřením na rezistentní formu tuberkulózy.

Současné genetické metody představují zásadní nástroj pro přesnou identifikaci mykobakteriálních kultur, přispívají k vývoji taxonomie a rozšiřování poznatků o rodu *Mycobacterium*<sup>4,44</sup>. Genetické identifikační metody jsou přínosem pro významné urychlení diagnostiky infekcí způsobených pomalu rostoucími a obtížně kultivovatelnými druhy<sup>41,46</sup>.

Nesporný význam mají amplifikační genetické metody pro detekci mutací genomu *M. tuberculosis* podmiňující rezistenci na antituberkulotika (zejm. rifampicin)<sup>37,57-60</sup>. Oproti standardním metodám stanovení rezistence je možno provést detekci přímo ze vzorku

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 11/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

klinického materiálu ještě v den doručení vzorku a získat velmi spolehlivý výsledek. Vyšetření je možno doporučit ve všech případech mikroskopicky pozitivního sputa pacientů s podezřením na infekci rezistentním kmenem MTBC. Vysoce rizikovými mohou být lidé dříve na tuberkulózu léčení, osoby s potvrzeným kontaktem s MDR-TB a pocházející z oblastí s vysokou prevalencí MDR-TB<sup>1</sup>.

Epidemiologická analýza kmenů MTBC probíhá na specializovaných pracovištích. Pro svoji náročnost není předmětem diagnostiky rutinních mykobakteriologických laboratoří. Uplatňuje se zejm. metoda MIRU-VNTR (mycobacterial intersperced repetitive units - variable number tandem repeats)<sup>61,63,65</sup>.

### **MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie pro identifikaci mykobakterií**

Metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií (Matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight) je analyzován hmotnostní profil molekul strukturálních bílkovin 16S podjednotky mikrobiálních ribozomů. Spektrum bílkovin tvořících ribozomy je druhově specifické. Změřené spektrum hmotnostních profilů bílkovin testovaného kmene je srovnáno s databází známých referenčních druhů. Výsledku je reálně dosáhnout během několika minut. Metoda je již v současnosti rozšířená a ve stále se zvyšující míře využívaná laboratořemi pro rychlou identifikaci mikroorganismů.

Studie zaměřené na přínos metody pro identifikaci mykobakterií prokázaly, že hmotnostní spektrometrie je potenciálně vhodným prostředkem pro typizaci i této skupiny mikroorganismů<sup>66,67</sup>. Pro rutinní využití MALDI-TOF v oblasti mykobakteriologie je však stále potřeba podrobnější validace a standardizace postupu přípravy kmenů.

## **Latentní tuberkulóza**

V úvodu uvedme, že nejběžnějším a dosud hojně využívaným nástrojem pro diagnostiku latentní tuberkulózy je kožní tuberkulinový test podle Mantoux. Metoda se používá v klinické praxi především při vyšetřování osob v riziku nákazy. Kožní test se provádí nejčastěji u epidemiologicky významných kontaktů s pacienty s aktivní tuberkulózou, dále u osob před zahájením biologické léčby (terapie modifikátory imunitní odpovědi). Výpovědní hodnota výsledku testu je však pro přesné stanovení diagnózy latentní infekce nízká. Postup a odečet může být ovlivněn nejednoznačností a subjektivitou interpretace vedoucí k falešně pozitivním i falešně negativním výsledkům. Limitující je krátká životnost tuberkulinu (antigenní směsi proteinů)

a problémem bývá neochota pacientů dostavit se v řádném termínu k odečtu zkoušky<sup>53</sup>. Častá falešná pozitivita testu při kolonizaci nebo infekci netuberkulózními druhy mykobakterií, a zvláště po BCG vakcinaci, představuje zásadní omezení testu<sup>1,53</sup>.

Potřeba spolehlivého, dostatečně citlivého a specifického testu k diagnostice latentní tuberkulózy vedla k vývoji detekčních metod prováděných z plné krve pacientů. Principem IGRA (interferon gamma release assay) testů je detekce T-lymfocytů, které po stimulaci antigeny typickými pro buňky *M. tuberculosis* produkují cytokin interferon- $\gamma$ . Dostupné jsou dva typy komerčních testů. QuantiFERON-TB Gold umožňuje kvalitativní zhodnocení produkce interferonu- $\gamma$  T-lymfocyty aktivovanými směsí antigenů ESAT-6, CFP 10 a TB7.7(p4)<sup>1,54</sup>. V případě soupravy T-SPOT TB je hodnocen počet T-lymfocytů aktivovaných antigeny ESAT-6 a CFP 10 produkujících interferon- $\gamma$ .

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 12/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Detekce odpovědi buněčného imunitního systému je při použití IGRA metod, oproti tuberkulinovému testu, přesnější. Zřejmou výhodou je využití specifických antigenů a standardizace interpretačních kritérií. Použité antigeny jsou přítomny u *M. tuberculosis* a dále jen u několika málo druhů mykobakterií, konkrétně u *M. szulgai*, *M. marinum* a *M. kansasii*. Naopak chybí u vakcinačního kmene *M. bovis* BCG. Výsledky testů proto nejsou ovlivněny předchozí vakcinací nebo expozicí většiny druhů mykobakterií z prostředí.

Stejně jako u tuberkulinového testu nelze ani pomocí IGRA metod odlišit latentní infekci od aktivního, nebo dříve úspěšně léčeného, onemocnění. Z tohoto důvodu je také vyloučeno použití IGRA metod ke kontrole úspěšnosti léčby. Výsledek je možné mít již po 24 hodinách od obdržení vzorku krve. Ani jeden z testů není primárně určen pro diagnostiku aktivního onemocnění<sup>54,55</sup>. Detekce latentní TBC je povinnou součástí vyšetření před zahájením biologické léčby. Viz dokument ČLS JEP ČPFS Doporučení Sekce pro tuberkulózu při ČPFS pro biologickou léčbu preparáty blokujícími účinek TNF.

## **Vysvětlivky, technické informace, limity metod Odběrové nádoby**

Používají se dobře těsnící, sterilní odběrové nádoby, vhodné pro centrifugaci.

## **Kultivační vyšetření vzorků klinického materiálu**

Laboratoř musí splňovat aktuálně vyžadované normy pro kvalitu práce a musí mít zavedený systém interních kontrol kvality. Musí se účastnit programů externího hodnocení kvality a vykazovat přijatelnou míru úspěšnosti v těchto programech.

Sestava pevných kultivačních půd by měla být volena s ohledem na skutečnost, že určité složky médií mohou potlačovat růst některých mykobakteriálních druhů.

Zkoncentrování vzorků centrifugací zvýší citlivost přímého mikroskopického vyšetření<sup>70</sup>.

Automatické systémy byly testovány na detekci širokého spektra mykobakterií. Pro izolaci mykobakterií ale není vhodné je používat samotné<sup>41</sup>. Důvodem je pouze jedna teplota kultivace, potřeba přidávání růstových faktorů pro obtížně rostoucí mykobakterie a také různé složení kultivačních médií ve spojení se skutečností, že některé druhy preferují určité živiny v konkrétní půdě. Některé kmeny *M. tuberculosis* rostou pouze na vaječných půdách<sup>10</sup>.

Negativní výsledek testů, zvláště u mimoplicních vzorků (např. likvor, pleurální výpotek, moč), tuberkulózu či jinou mykobakteriózu nevyklučuje.

Před zahájením vyšetřování kontaktů by měl být znám výsledek odlišení NTM, nebo potvrzení *M. tuberculosis*.

## **Vyšetření vzorků klinického materiálu molekulárně biologickými metodami**

Při podezření na infekci multirezistentním kmenem MTBC je genetické vyšetření rezistence na rifampicin opodstatněné. V případě diagnostikované MDR-TB je totiž nutné včas zahájit adekvátní léčbu, stejně jako epidemiologická opatření dle platných standardů.

Vyšetření bioptických vzorků amplifikačními testy by mělo být provedeno u mikroskopicky pozitivních vzorků, event. u závažného podezření na TBC, avšak u vzorků, které nebyly ošetřeny fixační či jinou metodou ovlivňující výsledek molekulárně biologické metody.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 13/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Postupy musí být prováděny ve shodě s pokyny výrobce na pracovišti s mikrobiologickou odborností. Všechny vzorky musí být zároveň vyšetřeny kultivačně a až na výjimky i mikroskopicky.

## PREANALYTICKÁ FÁZE

[PI – příručka indikací vyšetření](#)

### Administrativní náležitosti, technické informace /omezení

#### Priorita

Stupeň priority 1

[PP - Instrukce k příjmu materiálu na pracoviště](#)

#### Zápis do LIS

Názvy vyšetření, operací

[PP\\_ značení vzorků a jejich zápis do systému, PP\\_ řešení drobných pochybení v preanalytické fázi](#)

#### Průvodky

Způsob archivace, způsob vyplnění průvodky klinikem, nezbytné informace

[LP – Odběr materiálu, PK, F – neshody na příjmu a jejich řešení, S\\_ laboratoř a personál, K\\_ Kniha závad vzorků a průvodek v preanalytické fázi](#)

## ANALYTICKÁ FÁZE

### 1.Odběr vzorků, přeprava, skladování

#### 1.1. Bezpečnostní opatření <sup>72-78</sup>

- při odběrech dodržovat zásady asepse
- vzorky odebírat do vhodných, dobře uzavíratelných odběrových nádob a přepravovat v souladu se zásadami správné laboratorní praxe
- žádanky zasílat odděleně od vzorků, např. v igelitovém sáčku.
- v případě transportu izolátů *M. tuberculosis* komplexu dodržovat poštovní a přepravní předpisy pro biologické činitele skupiny 3

Veškeré postupy jsou prováděny dle vyhlášky 306/2012 Sb. o podmínkách předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče.

#### 1.2.Optimalizace podmínek

##### 1.2.1. Doba mezi odběrem a zpracováním vzorku

- odběr vzorků pokud možno provést před zahájením antimikrobiální terapie

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 14/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

- vzorky mají být během jednoho pracovního dne převezeny a předány do laboratoře a tam co nejdříve zpracovány<sup>4</sup>. Měly by být brány v úvahu požadavky jednotlivých testovacích laboratoří.

### 1.2.2. Zvláštní doporučení pro minimalizaci poškození nebo znehodnocení vzorku

Pokud bude zpracování vzorku opožděno, je vhodné uchovávat vzorek v lednici<sup>76</sup> z důvodu omezení přerůstání nespecifickou bakteriální flórou. Zpoždění více než 72 hodin je nežádoucí.

#### Jiné vzorky než krev

Pokud převoz vzorků ke zpracování v laboratoři trvá déle než hodinu, měly by se, s výjimkou krve, uchovávat v chladu.

#### Žaludeční výplach

Pokud od odběru žaludeční laváže po její zpracování uplyne doba delší než 4 hodiny, měl by se výplach neutralizovat uhličitánem sodným (viz níže)<sup>79</sup>.

#### Stěry a výtěry

Nesmí se používat soupravy s transportním médiem (např. médium s aktivním uhlím)!

#### Bioptický a sekční materiál

K odebrané tkáni ani jinému materiálu se nesmí přidávat fixační ani konzervační látky!

#### Krev

Krev se má převézt a vložit do automatického kultivačního systému jak nejdříve to je možné.

## 1.3. Správný druh vzorku a metody odběru

### 1.3.1. Sputum

Největší výtěžnost mají vzorky odebrané ráno po probuzení. Proto se sputum odebírá ráno, na lačno, před čištěním zubů a bez předchozího výplachu úst vodovodní vodou z důvodu možné kontaminace vzorku NTM. Pro získání kvalitního vzorku z dolních dýchacích cest se doporučuje nejprve důkladně zakašlat se zavřenými ústy. U nových pacientů se odebírají alespoň 3 vzorky ve třech po sobě následujících dnech. U léčených pacientů se kontrola provádí v závislosti na klinickém stavu, nejméně však 1x za měsíc. Požaduje se 2-5 ml ranního sputa dodaného v širokých sterilních odběrových nádobách.

Je-li kašel suchý a pacient spontánně nevykašlává, může získání sputa pomocí fyzioterapie, posturální drenáž nebo „indukce sputa“ - nebulizovaná inhalace (tj. inhalace aerosolu z trysky) solného roztoku s následným vykašláním. Jde o tzv. indukované sputum, které se takto označí, aby nebylo zaměněno za sliny!

Pozn. Sliny jako materiál na mykobakteriologické vyšetření jsou naprosto nevhodné.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 15/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

### 1.3.2. Jiný respirační materiál (bronchoalveolární laváž, bronchiální výplach, sekret odsátý z dýchacích cest)

Za účelem vyšetření na mykobakterie se bronchoskopické vyšetření provede v případě, že nelze získat sputum, ať už spontánní či indukované. Odběr se provede dle metodiky endoskopického pracoviště. Do laboratoře se zašlou alespoň 2-3 ml tekutiny ve sterilní odběrové nádobě.

Pozn. Je třeba eliminovat kontaminaci bronchoskopu vodou z vodovodu, která může obsahovat NTM z prostředí.

### 1.3.3. Laryngální výtěr

Provede se pouze, není-li možné získat některý z výše jmenovaných respiračních materiálů. Technika odběru totiž představuje vysoké riziko nákazy pro odebírající personál a výtěžnost vyšetření je nízká. Navíc se laryngální výtěr nevyšetřuje mikroskopicky. Stejně jako v případě sputa se odebírá ráno, nalačno, bez předchozí hygieny dutiny ústní. Odběr se provede na 3 laryngeální sondy zvlhčené sterilní destilovanou vodou (sondou je tampón ideálně na chrommolybdenovém drátě) zavedením nad epiglottis a po pacientově zakašlání. Sonda se pak vrátí do zkumavky.

Pozn. Mohou se přidat přibližně 2 ml sterilní destilované vody. V případě požadované kultivace na mykobakterie se sondy nikdy nezanořují do aktivního uhlí nebo jiného transportního média. Alternativně lze použít odběrové plastové tampony s ohebným koncem, takové aby bylo možno provést odběr popsáním způsobem, zkumavky pro zasunutí tamponu nesmí rovněž obsahovat transportní médium.

### 1.3.4. Moč

Odebírá se střední proud první ranní moči v množství alespoň 30 ml minimálně 3, lépe 5 dní po sobě, do sterilní odběrové nádoby se širokým hrdlem.

### 1.3.5. Pleurální punktát

K vyšetření se zasílá 20-50 ml asepticky odebraného punktátu. Lze zpracovat i objem menší (minimálně však 3 ml), senzitivita vyšetření je však v tomto případě omezena. Pleurální tekutina představuje tzv. paucibacilární, tj. ne příliš senzitivní, materiál pro detekci *M. tuberculosis*. Negativní výsledek z punktátu pleury proto diagnózu nevylučuje. Větší výtěžnosti vyšetření než punkce dosahuje biopsie pleury<sup>10</sup>. Do laboratoře se transportuje v těsně uzavíratelných sterilních odběrových nádobách.

### 1.3.6. Likvor

Mozkomíšního moku se asepticky odebírá tolik, kolik je možné, minimálně 2 ml.

Pozn. Pokud je po počáteční lumbální punkci k dispozici pouze malé množství likvoru a pokud výsledky počtu buněk a bílkovin ukazují na tuberkulózní meningitidu, měl by se provést druhý odběr kvůli získání většího množství vzorku, a tím zvýšení šance získat pozitivní kultury<sup>21</sup>.

### 1.3.7. Uzlina lymfatická

Bioptický nebo sekční materiál o velikosti 1 cm<sup>3</sup> a více se odebírá do sterilní odběrové nádoby a zasílá bez fixačního a konzervačního média! K zabránění vysychání je vhodné přidat SDV nebo FR.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 16/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

### 1.3.8. Kůže

Pro kožní tkáň platí totéž co pro uzlinu a navíc, kromě obvyklých 37 °C, se zakládá kultivace i při nižší teplotě (obvykle 28-30 °C).

### 1.3.9. Žaludeční aspirát, laváž

Žaludeční šťáva se nejčastěji odebírá u dětí a u osob, které nejsou schopny sputum vyplivnout do odběrové nádoby, ale polykají ho. Vzorky se odebírají žaludeční sondou a následným nasátím do injekční stříkačky nalačno, nejlépe ve 3 vzorcích tři dny za sebou<sup>78</sup>. Odebírá se buď přímo žaludeční šťáva, nebo se provede výplach žaludku aplikací 50-100 ml vlažné SDV, která se následně odsaje. Má být odebráno alespoň 5 ml žaludeční šťávy, nebo alespoň 50 ml výplachu. Aspirovaný výplach by měl být do 4 hodin od odběru doručen do laboratoře a zpracován, aby se předešlo znehodnocení mykobakterií kyselým prostředím. Nelze-li tento čas dodržet, je třeba vzorek neutralizovat přidáním stejného objemu roztoku uhličitanu sodného (10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na 100 ml sterilní destilované vody) za kontroly pH (6,8-7,2) pomocí indikátoru pH.

### 1.3.10. Stolice

Požaduje se vzorek o velikosti lískového ořechu nebo o objemu alespoň 1 ml. V případě podezření na TBC gastrointestinálního traktu je preferována biopsie sliznice střeva.

Pozn. Izolace mykobakterií ze stolice je nespolehlivá a má nízkou míru úspěšnosti v důsledku velké kontaminace stolice jinými bakteriemi.

### 1.3.11. Jiný materiál

Výtěry a stěry z pištěl, hnisavých procesů a ran

Materiál se odebírá na tampóny předem zvlhčené SDV. Pro vyšší pravděpodobnost zachytu u paucibacilárních vzorků je optimální odběr 3-6 stěrů v jednom vzorku. Nesmí se zasunovat do transportního média! Vhodné naopak je tampón ponořit do cca 2 ml SDV.

Pozn. Ideální vzorek je hnis odebraný do stříkačky. Tampóny s hnisem jsou méně vhodné, protože mykobakterie se přichytí k tampónu<sup>79</sup>. Vždy je preferován tekutý materiál nebo tkáň.

Tkáň - bioptický a nekroptický materiál

Bioptický nebo sekční materiál o velikosti 1 cm<sup>3</sup> a více se zasílá zásadně bez fixačního či konzervačního média! K zabránění vyschnutí se má ke vzorku přidat SDV.

Pozn. Pokud je ve větším vzorku přítomna kazeózní část, měla by se vyjmout ke zpracování. Většina mikroorganismů bývá nalézána na periférii kazeózní léze. Tkáň se v laboratoři před dekontaminací obvykle homogenizují.

Punktáty jiné než pleurální

Za aseptických podmínek se odebírají alespoň 2-3 ml vzorku.

Krev

Krev není ve většině případů vhodný vzorek pro vyšetření na mykobakterie (ani na klasickou kultivaci a mikroskopii ani na PCR)! V rutinních mykobakteriologických laboratořích se hemokultivace neprovádí.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 17/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Pozn. Hemokultivace má význam zejména u imunokompromitovaných pacientů, nejčastěji s HIV/AIDS. Mykobakteriální infekce u této skupiny pacientů vede častěji k mykobakteriémii, diseminaci a sepsi. Hemokultivační systémy by proto měly být k dispozici alespoň ve vybraných laboratořích spolupracujících s AIDS centry. Krev je odebírána u lůžka pacienta do speciálních hemokultivačních zkumavek (odběr a manipulace s odběrovými zkumavkami je prováděna dle doporučení výrobce konkrétního systému), odběry by měly být minimálně dva. Nejmenší objem krve u dospělých je 10 ml (odebraný do jedné či rozdělený do dvou zkumavek - dle doporučení výrobce), u dětí stačí menší množství.

Pro odběr vzorků na vyšetření molekulárně biologickými metodami platí stejné zásady jako u kultivačních metod. Protože je vzorek vždy vyšetřován paralelně oběma metodami, musí mít odpovídající kvalitu i kvantitu.

#### 1.4. Dostatečné množství vzorku a vhodný počet vzorků

Viz bod 1.3., počet a frekvence odebraných vzorků závisí na klinickém stavu pacienta.

[LP – Odběr materiálu,](#)

#### 1.5. Transport

Viz bod 1.1. V případě transportu zásilkovou službou se řídit platnými legislativními předpisy.

Pozn. Balení a přeprava zásilek v ČR<sup>84</sup>.

[PR\\_7 Provozní řád, PREP\\_Protiepidemická řád, I\\_xy Instrukce k zasílání materiálu poštou](#)  
[I\\_Příjem a skladování vzorku v laboratoři, PP\\_Svoz biologického materiálu a rozvoz výsledků a odběrového materiálu, LP - Odběr materiálu, F\\_výdej odběrového materiálu, S\\_Seznam odběrového materiálu na příjmu.](#)

## 2. Zpracování vzorků v mikrobiologické laboratoři

### 2.1. Posouzení bezpečnosti <sup>72-78</sup>

*M. tuberculosis* komplex (s výjimkou kmene BCG) patří mezi biologické činitele skupiny 3 (Příloha č. 7 k Nařízení vlády č. 361/2007 Sb.).

Laboratorní metody rizikové z hlediska vzniku infekčního aerosolu musí být prováděny biohazardním boxu v laboratoři splňující požadavky pro práci s biologickými činiteli skupiny 3 v souladu s Nařízením vlády č. 361/2007 Sb. Podmínky ochrany zdraví při práci (Zákon č. 309/2006 Sb.).

V mykobakteriologických laboratořích je nezbytné používat dezinfekční prostředky vyhovující požadavkům norem pro hodnocení mykobaktericidního a tuberculocidního účinku. Režim se řídí provozním řádem daného pracoviště. Dezinfekční prostředky se používají v souladu s návodem výrobce.

Při používání zdroje tepla v bezpečnostním boxu v laboratoři je nutné optimalizovat efektivitu boxu.

Při centrifugaci se používají uzavřené kyvety (výkyvné závěsy). Po centrifugaci se doporučuje otevírat kyvety v boxu.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 18/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Použitý materiál se předává k autoklávování ihned po použití a autoklávuje se bez odkladu.

Tam, kde je to možné, se přednostně používá plastový spotřební materiál před skleněným.

Pozn. Fixace preparátů teplem neusmrtí *Mycobacterium* species.

## 2.2. Standardní minimum

Každý vzorek (mimo moče, LV a jiných výtěrů) se vyšetřuje mikroskopicky a kultivačně (1 tekutá půda nejlépe metabolickou metodou plus minimálně 2 pevné půdy).

Moč a laryngeální výtěr se vyšetřují kultivačně (1 tekutá půda nejlépe metabolickou metodou plus minimálně 2 pevné půdy).

## 2.3. Mikroskopie<sup>69,70</sup>

Mikroskopické vyšetření přináší rychlou informaci o (ne)přítomnosti ART a je tak základní diagnostickou metodou při vyhledávání osob s aktivní tuberkulózou.

Barvení „na acidorezistenci“ využívá schopnosti mykobakterií podržet jednou přijaté barvivo i při následném odbarvování kyselým alkoholem. Barvitelnost mykobakterií se zvyšuje za horka nebo při použití koncentrovanějších barviv a také v přítomnosti mořidel (např. fenol).

V laboratorní praxi se při diagnostice mykobakteriálních infekcí běžně používají dvě metody mikroskopického vyšetření: barvení fluorochromy a prohlížení preparátů fluorescenčním mikroskopem v UV světle a barvení podle Ziehl-Neelsena s prohlížením preparátů ve viditelné části spektra světelným mikroskopem.

Vyšetření fluorescenční metodou je výhodné, protože umožňuje odečítání při menším zvětšení (200-400x) a tudíž prohlédnutí větší plochy připadající na jedno zorné pole. Stačí prohlédnout méně zorných polí. Pozitivně se jeví preparáty (zářící žlutobílé tyčinky na tmavém pozadí) je však třeba přebarvit metodou dle Ziehl-Neelsena a ověřit prohlédnutím ve světelném mikroskopu, protože fluorochromy se váží i na některé jiné buněčné struktury.

Fluorescenční mikroskopie se používá k vyšetření většiny vzorků. Mikroskopicky se standardně nevyšetřují moč a výtěry (laryngeální a zpravidla ani jiné).

Preparáty pro světelnou mikroskopii, obarvené podle Ziehl-Neelsena, prohlížíme binokulárním mikroskopem (celkové zvětšení až 1000x) při použití imerzního objektivu (zvětšení 100x) a okuláru se zvětšením 6-10x. Mykobakterie se jeví jako červené tyčinky na zeleném, popř. modrém pozadí a jsou různě morfologicky uspořádané. Prohlížíme alespoň 50 zorných polí.

Světelná mikroskopie umožňuje detailnější zhodnocení morfologie ART. Navíc můžeme pozorovat eventuální přidruženou nespecifickou flóru, která by mohla ztížit další identifikaci či stanovení citlivosti. Barvení dle ZN se používá především k ověření pozitivních kultur.

### 2.3.1. Příprava preparátu

#### Ze vzorku biologického materiálu:

Mikroskopický preparát se většinou připravuje z dekontaminovaného vzorku. Výsledek je dostupný obvykle následující pracovní den po zpracování vzorku. V indikovaných případech je možné připravit mikroskopický preparát přímo ze vzorku. Likvor a jiný tekutý materiál je

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 19/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

vhodné nejdříve centrifugovat. U paucibacilárních materiálů je vhodné zhotovit vrstvený preparát. U tkání je možné provést otiskový preparát.

Nejčastěji se nátěr připravuje z dekontaminovaného *sputa* přenesením kapky sedimentu pipetou na podložní sklíčko po naočkování kultivačních půd. Výjimečně, je-li potřeba provést mikroskopické vyšetření rychle, tedy před zpracováním pro kultivaci, vyhledají se ve vzorku *sputa* především hnisavé vločky nebo pevné části a tyto se přenesou na sklíčko, kde se rovnoměrně rozetřou.

**Pro mikroskopickou kontrolu z pozitivního vzorku:**

Z tekutého média se odebere 1,5 ml pozitivního vzorku ze dna zkumavky a přenesou jednorázovou pipetou do mikrozkušavky. Centrifuguje se 10 min při 12 000 x g. Supernatant se slije a sediment se přenesou na označené podložní sklíčko.

Z pevné půdy se odebere kolonie bakteriologickou kličkou a suspenduje v kapce SDV na podložním sklíčku.

Preparáty se usuší a fixují teplem při 110 °C po dobu 10 min a následně se barví.

### 2.3.2. Barvení preparátu

**Barvení směsí auraminu a rhodaminu pro fluorescenční mikroskopii<sup>80</sup>:**

Příprava roztoků pro barvení:

**Barvicí roztok fluorochromů**

- 1 g Auraminu
- 0,1 g Rhodaminu B

Doplní se SDV do celkového objemu 1000 ml.

**Odbarvovací roztok**

- 4 g NaCl
- 4 ml koncentrované HCl

Doplní se lihobenzínem (nebo 96% alkoholem) do celkového objemu 1000 ml.

**Dobarvovací roztok**

- 2 g kyselého fuchsinu
- 2 ml koncentrované HCl

Doplní se SDV do celkového objemu 1000 ml

Připravený roztok fluorochromů/i obarvené preparáty je třeba **chránit před světlem**.

**Postup barvení:**

- barví se roztokem fluorochromů **15 min**
- slije se a opláchne vodou
- odbarví se odbarvovacím roztokem **5 min**
- slije se a opláchne vodou
- dobarví se dobarvovacím roztokem **2 min**
- slije se a opláchne vodou

**Barvení karbolfuchsinem pro světelnou mikroskopii:**

**a/ klasicky podle Ziehl – Neelsena - se zahříváním:**

Příprava roztoků pro barvení:

**Barvicí roztok** karbolfuchsinu se připraví smícháním přefiltrovaného roztoku A a B v poměru 1:10

Roztok A:	fuchsin (krystalický) bázičkový	10 g
	lihobenzín (nebo alkohol 96%)	100 ml
Roztok B:	fenol (krystalický)	50 g

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 20/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

SDV 200 ml  
- po rozpuštění se SDV doplní do 1 000 ml

**Odbarvovací roztok**

koncentrovaná HCl 30 ml  
lihobenzín (nebo alkohol 96%) 970 ml

**Dobarvovací roztok** - 1% vodný roztok malachitové zeleně (nebo metylenové modře)

malachitová zeleň (nebo metylenová modř) 10 g  
SDV 1000 ml

**Postup barvení:**

- usušené fixované nátěry se rozloží na barvicí mřížku tak, aby se navzájem nedotýkaly
- barví se roztokem karbolfuchsinu **5 min** a zahřívá plamenem 3x do výstupu par
- slije se a opláchne vodou
- odbarví se odbarvovacím roztokem **2 - 3 min (minimálně 1 min)**
- slije se a opláchne vodou
- dobarví se dobarvovacím roztokem **20 - 60 s**
- slije se a opláchne vodou

**b/ dle Kinyouna – za studena**

Příprava roztoků pro barvení:

**Barvicí roztok** karbolfuchsinu se připraví smícháním přefiltrovaného roztoku A a B

Roztok A: fuchsin bázičkový 34 g  
lihobenzín (nebo alkohol 96%) 167 ml

Roztok B: fenol (krystalický) 68 g  
SDV 250 ml

- po rozpuštění se doplní SDV do 833 ml

Po důkladném rozpuštění látek se smísí roztok A + B a ponechá 2 dny odstát, před použitím se obsah lahve lehce rozmíchá (otáčením lahve).

**Odbarvovací roztok**

koncentrovaná HCl 30 ml  
ihobenzín (nebo alkohol 96%) 970 m

**Dobarvovací roztok** - 1% vodný roztok malachitové zeleně (nebo metylenové modře)

malachitová zeleň (nebo metylenová modř) 10 g  
SDV 1000 ml

Roztoky se uchovávají v tmavé lahvi, týden při laboratorní teplotě.

Pro každou novou šarži barvicích roztoků se barví i sklíčka kontrolní.

**Postup barvení:**

- usušené fixované nátěry se rozloží na barvicí mřížku tak, aby se navzájem nedotýkaly.
- barví se roztokem karbolfuchsinu **5 min**
- slije se a opláchne vodou
- odbarví se odbarvovacím roztokem **1 min**
- slije se a opláchne vodou
- dobarví se dobarvovacím roztokem **1 min**

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 21/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

- slije se a opláchne vodou

### 2.3.3. Kroky následující po barvení

Preparáty se suší ve vertikální nebo šikmé poloze (v sušičce při 60 °C nebo při laboratorní teplotě v bezprašném prostředí) a prohlíží v závislosti na použitém barvení buď fluorescenčním nebo světelným mikroskopem.

[PP\\_ Pracovní postupy barvení mikroskopických preparátů.](#)

### 2.3.4. Hodnocení mikroskopického nálezu

#### Fluorescenční barvení

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

#### Ziehl-Neelsen/Kinyoun

- 0 ART nenalezeny (v 50 zorných polích)
- 1-9 ojedinělé ART (udává se počet v 50 zorných polích)
- + 10 - 20 v 50 zorných polích
- ++ 21 - 100 v 50 zorných polích
- +++ více než 100 v 50 zorných polích

Pozitivní preparáty se zbaví imerzního oleje ponořením na 5 min do xylolu v kyvetě. Objektiv je třeba po prohlédnutí každého pozitivního nátěru utřít čtverečkem buničité vaty, aby nedošlo k náhodnému přenesení ART na další preparát.

Mikroskopická pozitivita u nově zjištěného nemocného se ihned telefonicky hlásí na oddělení či do odesílající ordinace.

### 2.4. Dekontaminace a homogenizace vzorků biologického materiálu

Dekontaminace, homogenizace a neutralizace vzorku jsou podmínkou zpracování materiálu pro kultivační, mikroskopická a amplifikační vyšetření. Potlačení růstu průvodní nespécifické flóry je nezbytným krokem při zpracování většiny druhů vyšetřovaných vzorků. Využívá se relativní odolnosti mykobakterií k anorganickým kyselinám a sodnému louhu. Sediment získaný po dekontaminaci se použije k přípravě nátěru pro mikroskopii, očkuje se na kultivační média a někdy se část vzorku použije jako vstupní materiál pro amplifikační vyšetření.

Bez dekontaminace – tímto způsobem je možno inokulovat přímo na půdy pouze likvor, punktáty a event. jiné sterilně odebrané vzorky, u nichž se nepředpokládá příměs jiných mikroorganismů. Má-li být současně provedeno vyšetření amplifikačními metodami, část těchto materiálů se dekontaminuje a inokuluje na další sadu půd.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 22/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

### 2.4.1. Dekontaminace hydroxidem sodným (NaOH).

Jde o dlouhodobě prověřený, robustní a univerzální postup vhodný ke zpracování většiny druhů odebraných vzorků, především sput a jiných tekutých vzorků z respiračních cest.

Při dekontaminaci NaOH je nutno dbát na následující pravidla: **Koncentrace NaOH nesmí přesáhnout 4 %.** **Doba kontaktu s činidlem nesmí přesáhnout 30 min, po této době musí být směs neutralizována.**

#### Homogenizace

Probíhá při laboratorní teplotě kontinuálním nebo periodickým protřepáváním směsi vzorku a roztoku NaOH. Intenzita protřepávání je podmíněna konzistencí vzorku. K hutným vzorkům sputa je vhodné přidat sterilní skleněné kuličky o průměru cca 2 mm. Čas potřebný pro homogenizaci koreluje s maximální dobou působení dekontaminačního činidla a odvíjí se od postupu neutralizace, závislém na objemu používaných (preferovaných) odběrových souprav.

#### Neutralizace

Pokud se používají 50 ml odběrové nádoby, neutralizační činidlo se po 30 minutové kontaktní době přidává přímo ke směsi. Pokud o objemu 30 ml, po 10 minutách homogenizace se směs 20 min centrifuguje a neutralizační roztok se přidává k sedimentu po slítí supernatantu.

Při zpracování vzorku ve 30 ml zkumavkách s centrifugací se k sedimentu přidá **minimálně 15 ml** neutralizačního činidla. Odstranění většiny objemu NaOH dovoluje pouhé přidání sterilní destilované vody, vhodnější je však použití činidel s vyšší pufrací schopností jako jsou **fosfátový pufr o pH 6.8** nebo **slabý roztok HCl** (0,1 – 0,25%).

Při použití 50 ml zkumavek se směs doplní neutralizačním činidlem **do maximálního objemu**. V tomto případě je nutno **neutralizovat fosfátovým pufr**.

**Neutralizace musí být důkladná, neutralizační činidlo musí být přidáno v několikanásobně vyšším objemu oproti směsi vzorku a NaOH. Neutralizace je pro další procesy zásadní, pH vzorku po zpracování musí být 7,0±0,5.**

#### Koncentrace centrifugací

Koncentrace probíhá v průběhu dekontaminace a po neutralizaci. **Minimální doba pro zkoncentrování směsi činí 15 min při relativní síle 3000 x g** a je pro sedimentaci mykobakteriálních buněk dostačující. Maximální doba centrifugace není stanovena, může však být podmíněna časovou návazností dalších procesů. Maximální síla centrifugace není rovněž definována, ale je limitována odolností materiálu používaných zkumavek. Výsledný sediment (**max. 2 ml**) je po odstranění supernatantu resuspendován 1-2 ml vhodného činidla. Resuspendace ve fosfátovém pufru potencuje pufrací účinek. Při použití pufru nebo roztoku HCl při neutralizaci je možno k sedimentu přidat sterilní destilovanou vodu nebo fyziologický roztok.

#### Schéma postupu 4% NaOH:

**Ke vzorku se přidá roztok 4% (40 g/l, 1M) NaOH v poměru 1:1**

Množství přidávaného dekontaminačního roztoku závisí na kvalitě a kvantitě vzorku, ve většině případů je dostatečné smísení v poměru **vzorek : roztok NaOH 1:1**. Hutné vzorky

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 23/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

materiálů se mísí v poměru 1:2 až 1:3 a přidají se sterilní skleněné kuličky. Naopak vzorky čiré, bez příměsí se mohou doplnit v poměru 2:1, 3:1.

#### **Homogenizuje se při laboratorní teplotě**

na automatické třepačce kontinuálně **10** minut (v případě 30 ml odběrových nádobek)/**30** minut (jsou-li použity 50 ml odběrové nádoby), nebo manuálně protřepáváním či vortexováním v 5 minutových intervalech

#### **Neutralizuje se**

30 ml zkumavky - odstraněním dekontaminačního činidla centrifugací 20 min při 3000 x g, supernatant se opatrně slijí a k sedimentu (max. 1 ml) se přidá 15 ml neutralizačního činidla (SDV, roztok HCl, pufr pH 6,8)

50 ml zkumavky - nebo dolitím pufru pH 6,8 do plného objemu.

#### **Směs se zkoncentruje centrifugací 20 min\* při 3000 x g**

Supernatant se odstraní opatrným slitím, sediment (max. 1ml) se resuspenduje v 0,5-1 ml vhodného činidla.

#### **2.4.2. Další varianty dekontaminace pomocí NaOH**

Principem dekontaminačních postupů je použití 1-2% NaOH s přidavkem mukolytického činidla N-acetyl-L-cysteinu (NALC) nebo povrchově aktivní látky laurylsulfátu sodného. Metoda s NALC je přijatelnou alternativou dekontaminace 4% NaOH. Metoda s laurylsulfátem sodným není vhodná pro vyšetření vzorku amplifikačními a metabolickými metodami. Její použití je limitováno pouze na klasickou kultivaci a mikroskopické vyšetření.

#### **Schéma postupu dekontaminace NALC-NaOH:**

##### **Ke vzorku se přidá stejný objem dekontaminačního roztoku (2% NALC + 2% NaOH)**

Množství přidávaného dekontaminačního roztoku závisí na kvalitě a kvantitě vzorku, ve většině případů je dostatečné smísení v poměru **vzorek: roztok NALC-NaOH 1:1**. vzorky materiálů hutné se mísí v poměru 1:2 až 1:3 a přidají se sterilní skleněné kuličky. Naopak vzorky čiré, bez příměsí se mohou doplnit v poměru 2:1, 3:1. Roztok nesmí být starší než 48 hodin

##### **Homogenizuje se při laboratorní teplotě 30 minut.**

Manuálně protřepáváním v 5 minutových intervalech. Lehce se protřepe obrácením zkumavky, ne déle než 20 s tak, aby bylo dekontaminační činidlo v dostatečném kontaktu s celým vnitřním povrchem zkumavky; protřepávání nesmí být příliš intenzivní.

##### **Neutralizuje se**

dolitím pufru pH 6,8 do plného objemu.

##### **Směs se zkoncentruje centrifugací 20 min při 3000 x g**

Supernatant se odstraní opatrným slitím, sediment (max. 1ml) se resuspenduje v 0,5-1 ml pufru.

#### **Schéma postupu dekontaminace laurylsulfát sodný - NaOH:**

##### **Ke vzorku se přidá stejný objem dekontaminačního roztoku (30 g/l laurylsulfátu + 1% NaOH).**

Množství přidávaného dekontaminačního roztoku závisí na kvalitě a kvantitě vzorku, ve většině případů je dostatečné smísení v poměru **vzorek: roztok laurylsulfát-NaOH 1:1**.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 24/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Vzorky hutné a purulentní s příměsemi se mísí v poměru 1:2 až 1:3 a přidají se sterilní skleněné kuličky. Naopak vzorky čiré, bez příměsí, se mohou doplnit v poměru 2:1, 3:1.

#### **Homogenizuje se při teplotě 37 °C v termostatu**

po dobu **30** minut manuálním protřepáváním v 5 minutových intervalech. Lehce se protřepá obrácením zkumavky, ne déle než 20 s tak, aby bylo dekontaminační činidlo v dostatečném kontaktu s celým vnitřním povrchem zkumavky; protřepávání nesmí být příliš intenzivní.

#### **Neutralizuje se**

dolítím 0,25% roztoku HCl do plného objemu.

#### **Směs se zkoncentruje centrifugací 20 min při 3000 x g**

Supernatant se odstraní opatrným slitím, sediment (max. 1ml) se resuspenduje v 0,5-1 ml pufru.

### **2.4.3. Dekontaminace kyselinami**

Je náhradní, paralelní nebo následnou metodou pro dekontaminaci 4% NaOH u vzorků potenciálně masivně kontaminovaných G- bakteriemi – pseudomonádami. Jde především o moč, sekční materiál, hnis, aspiráty, jiné purulentní tekutiny, stolice a vzorky z respiračního traktu pacientů s cystickou fibrózou. Metody nejsou vhodné pro vyšetření vzorku amplifikačními a metabolickými metodami. Jejich použití je limitováno pouze na klasickou kultivaci a mikroskopické vyšetření. Vzhledem k nízké mukolytické aktivitě kyselin je nutno vzorky sputa před dekontaminací homogenizovat, vzorky stolice a moči upravit viz kapitola Speciální úprava vzorků. Pro expozici dekontaminačnímu roztoku a pro neutralizaci platí stejná pravidla jako u metody s 4% NaOH.

#### **Schéma postupu dekontaminace kyselinou sírovou (0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>):**

##### **Ke vzorku se přidá stejný objem 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

Směs se vortexuje 5 s, dekontaminační činidlo se nechá při manuálním protřepávání v 5 minutových intervalech 30 min působit při laboratorní teplotě.

##### **Neutralizuje se**

dolítím pufru pH 8 do plného objemu.

##### **Směs se zkoncentruje centrifugací 20 min při 3000 x g**

Supernatant se odstraní opatrným slitím, sediment (max. 1ml) se resuspenduje v 0,5-1 ml vhodného činidla.

#### **Schéma postupu dekontaminace kyselinou šťavelovou (3%):**

##### **Ke vzorku se přidá 3% roztok kyseliny šťavelové do plného objemu zkumavky**

Směs se vortexuje 5 s, dekontaminační činidlo se nechá, při manuálním protřepávání v 5 minutových intervalech 30 min působit při laboratorní teplotě.

##### **Směs se zkoncentruje centrifugací 20 min při 3000 x g**

Supernatant se odstraní opatrným slitím, sediment (max. 1ml) se resuspenduje v 1-2 ml 2% NaOH.

### **2.4.4. Speciální zpracování vzorků**

**Centrifugaci** je bezprostředně možno provést u vzorků většího objemu, jejichž část je tvořena balastní tekutinou, například bronchoalveolární laváž prováděná fyziologickým roztokem, moč a pleurální výpotek o objemu 30 ml a více.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 25/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Po centrifugaci materiálu při 3000 x g po dobu 20 minut se supernatant odstraní slitím do nádoby s dezinfekčním roztokem. Následně se zpracovává sediment.

**Homogenizací** lze upravit vzorky sputa o větším objemu hutné konzistence (např. purulentní sputum). Homogenizace vzorku je nutná před dekontaminací kyselými činidly. **Dithiothreiolem:** Ke vzorku se přidá stejný nebo dvojnásobný objem roztoku dithiothreiolu. Činidlo se ponechá při laboratorní teplotě za občasného vortexování působit do dosažení úplného zkapalnění vzorku. Centrifuguje se po dobu 20 min při 3000 g. Supernatant se opatrně slije do nádoby s dezinfekčním roztokem. Dále se dekontaminuje sediment s 1 ml supernatantu.

**Tkáně a pevné vzorky** se sterilní pinzetou vyjmou z odběrové nádoby, pomocí sterilního skalpelu se rozdělí (dle potřeby) na menší části, rozmělní ve sterilní třecí misce, nebo pomocí homogenizátoru (mlýnku) a přidá se k nim 1-7 ml (dle objemu vzorku) sterilního fyziologického roztoku. Opatrně se přenese zpět do nádoby pro další zpracování. Pokud je to nutné, tkáně a biopsie se před kultivací homogenizují a dekontaminují. Menší kousky tkáně a kosti je však možno za aseptických podmínek inkulovat přímo na pevná nebo obohacená tekutá média

**Stěry a výtěry** (vč. laryngálního) se před dekontaminací vytřepou v 5 ml fyziologického roztoku.

**Vzorky stolice, purulentní tekuté materiály a hnis** je vhodné před dekontaminací propláchnout fyziologickým roztokem.

#### Schéma postupu:

**a) Ke vzorku se přidá fyziologický roztok do plného objemu zkumavky,** přidají se sterilní skleněné kuličky, směs se vortexuje 20 s.

**b) Směs se zkoncentruje centrifugací 20 min při 3000 x g.**

Supernatant se odstraní opatrným slitím do sedimentu max. 1ml.

**Postup je možno ještě 2x opakovat, sediment se poté dekontaminuje**

#### **2.4.5. Vysvětlivky, limity metod, technické informace:**

Dosud nejsou dostupné podklady nebo komplexní zhodnocení, které by vedly k doporučení konkrétní metody jako jediné optimální. Metoda dekontaminace a její parametry mohou být různé pro jednotlivé typy vzorků, postup může být také podmíněn kompatibilitou s používaným systémem metabolické kultivace<sup>4,68,69</sup>. Před změnou, zavedením metody dekontaminace je vhodné postup validovat a v průběhu aplikace kontrolovat míru kontaminací, kvalitativní a časový nárůst kultur u mikroskopicky pozitivních vzorků.

Vzorky zasílané k mykobakteriologickému vyšetření je možno rozdělit do dvou skupin: vzorky odebírané z oblastí osídlených běžnou flórou a vzorky odebírané z oblastí přirozeně sterilních. Všechny vzorky s potenciální přítomností nespecifické mikroflóry musí být před očkovaním na kultivační média dekontaminovány. Proces dekontaminace snižuje riziko znehodnocení kultivačního průkazu mykobakterií přerůstáním ostatními mikroorganismy. Odolnost mykobakterií vůči používaným dekontaminačním činidlům je vyšší oproti ostatním mikrobům, nicméně ne absolutní. Proces dekontaminace nesmí být proto příliš intenzivní. Velmi intenzivní dekontaminace vede k falešně negativním výsledkům<sup>10</sup>.

**Materiály z primárně sterilních míst:** likvor, tkáně (vč. uzlin, kromě kůže), pleurální a jiné punktáty (osteoartikulární aparát, orgánové punktáty mimo purulentních) teoreticky

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 26/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

dekontaminaci nepotřebují. Praxe však ukázala, že v případě nedostatečného množství materiálu, kdy nelze zároveň vzorek zpracovat bez i s dekontaminací, je výhodnější dekontaminovat. Proto, v případě menšího množství vzorku, dáváme přednost zpracování s dekontaminací než bez ní. Přihlíží se rovněž k charakteru a konzistenci vzorku. Vzorky, které jsou lipoidní, obsahují serózní sraženiny nebo krev, je ve většině případů lepší homogenizovat a dekontaminovat, což je vhodné jak pro metabolické metody, tak pro PCR. Přijde-li vzorek v dostatečném množství (např. likvor více než 5 ml), doporučuje se část vzorku dekontaminovat a část ne.

U zpracování vzorků metodou s NALC-NaOH, nebo zejména s laurylsulfátem, se při intenzivním protřepávání může vytvářet množství pěny, která po otevření zkumavky expanduje. Protřepávání nesmí být příliš intenzivní, zejména při zpracování ve zkumavkách o objemu 50 ml, kdy se dolévá neutralizační činidlo bez centrifugace. Při postupu s centrifugací je pěna eliminována.

Pro určení intenzity centrifugace se používá relativní centrifugační síla vyjádřená násobkem g, rychlost otáček ve vztahu ke g je závislá na parametrech centrifugy a délce ramen rotoru. Ty se u různých typů přístrojů liší a rychlost otáček se musí přizpůsobit požadovanému g.

Při zpracování vzorků centrifugací je nutno do celkového času centrifugace započítat interval pro zvyšování otáček centrifugy a dobu brzdění. Hlavní doba centrifugace se počítá od dosažení adekvátní rychlosti otáček centrifugy.

Pozn. Obvykle je vhodné pro centrifugaci nastavit interval **20 min** zajišťující maximální centrifugační sílu x g po dobu 15 minut. Je však nutno přizpůsobit dobu homogenizace tak, aby celková doba homogenizace + centrifugace s dekontaminačním činidlem nebyla delší než 30 min!

Supernatant se po centrifugaci vždy slévá do nádoby s dezinfekčním roztokem.

Veškeré postupy zpracování vzorků musí být prováděny tak, aby bylo minimalizováno riziko kontaminace vnější a samozřejmě také vzájemné kontaminace vzorků! Činidla a reagensie používané pro zpracování vzorků musí být sterilní. Pro každý vzorek zvlášť musí být použity jednorázové pipety.

## 2.5. Průkaz nukleových kyselin – amplifikační testy

Pro průkaz NK ze vzorku se používá alikvot dekontaminovaného vzorku. Pokud nelze zpracovat ihned, uchová se při teplotě pod  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zpracování vzorku se řídí návodem výrobce diagnostického setu.

## 2.6. Kultivace

a) Kultivační média se připravují dle návodu výrobce

b) 0,2 ml vzorku se po zpracování očkuje na povrch pevného kultivačního média (LJ, Ogawova nebo jiná vhodná pevná půda) a do tekuté kultivační půdy (Šulova, Middlebrook

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 27/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

7H9), nebo do lahvíček automatického systému (v množství daném výrobcem, obvykle 0,5 ml)

c) Vzorky materiálu vyžadujícího speciální kultivační podmínky (osteartikulární aparát, kožní biopsie a stěry z periferie, periferní uzliny, punkce z periferie, prostatický exprimát, sperma, stěry a odběry z oka) se očkují na dvě sestavy kultivačních médií, z nichž jedna je kultivována při teplotě 28-30 °C.

d) Naočkovaná pevná média se ponechají v přiměřeně nakloněné poloze tak, aby bylo inokulum rozprostřeno po celém povrchu minimálně 24 hodin. Lze také po naočkování pevných půd opatrně 4x pomalým kývavým pohybem přelit inokulem celou plochu pevné půdy a kmeny uložit ve vertikální poloze.

e) Pevné půdy se inkubují v termostatu při 35-37 °C (28- 30°C, 42°C) po dobu 9, případně 12 týdnů. Odečítání se provádí ve 3., 6. a 9. týdnu, suspektní nárůst se ověřuje mikroskopicky<sup>46</sup>.

f) Lahvičky metabolických systémů se zavádí do automatického přístroje dle návodu výrobce. Inkubační doba je stanovena výrobcem, může však být prodloužena tam, kde je to žádoucí (např. vzorky malého objemu, likvor). Všechna média, která byla automatickým systémem po uplynutí stanovené doby vyhodnocena jako negativní, je možné ještě před zlikvidováním vizuálně zhodnotit. Lze zaznamenat nárůst kolonií, který nebyl automatickým systémem detekován, a eliminovat ak riziko znehodnocení potenciálně pozitivních vzorků.

g) Záchyt mykobakterií v likvoru může být zvýšen přidáním tekutého média (Middlebrook 7H9, Šula) přímo ke vzorku do původní odběrové nádoby a její inkubací v termostatu při 35-37 °C nebo vypláchnutím odběrové nádoby médiem z lahvičky pro metabolickou kultivaci. Je známo, že mykobakterie mohou být přichyceny k plastovým stěnám odběrových nádobek.

h) Pozitivní kultury se ověřují mikroskopicky. Hodnotí se přítomnost acidorezistentních tyčinek po obarvení dle Ziehl-Neelsena (barvení dle ZN umožňuje detailnější zhodnocení morfologie).

i) Kultury s mikroskopicky ověřenou přítomností ART se dále identifikují. Neprovádí-li daná laboratoř identifikaci, posílá za tímto účelem kulturu do příslušného regionálního centra (přičemž se řídí předpisy pro zaslání a transport)<sup>85</sup>.

Pozn. Při nedostatečné kvantitě vzorku pro všechna potřebná vyšetření by měla být prioritou vhodného testu stanovena na základě obecných doporučení pro lékařskou mikrobiologii.

[PP\\_Pracovní postup očkování kultivačních médií.](#)

### 2.6.1. Hodnocení kultivačního vyšetření

Pro hodnocení pozitivních kultivačních nálezů se používá schéma odpovídající kódování pro Informační systém bacilární tuberkulózy:

1 - 9 ojedinelé kolonie, uvádí se jejich počet

+ 10 - 20 kolonií

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 28/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

++ 21 - 100 kolonií

+++ nepočítatelný počet kolonií, blanka na povrchu tekuté půdy, splývající růst na pevné půdě.

### 2.6.2. Parametry kultivace mykobakterií na základě klinického stavu

Klinický stav/forma onemocnění	Standardní média	Inkubace			Odečítání
		Teplota °C	Podmínky	Doba	
Všechny typy materiálu	Automatický systém	35-37	Aerobní	Dle doporučení výrobce	Průběžné*
	LJ + Ogawa	35-37	Aerobní	9 týdnů, dle potřeby prodloužit na 12	min. v intervalech 3, 6, 9 týdnů
Krev Kostní dřev	Automatický systém	35-37		Dle doporučení výrobce	Průběžné*
Rozšířená kultivace:					
Klinický stav/forma onemocnění	Doplňková média	Inkubace			Odečítání
		Teplota °C	Podmínky	Doba	
Infekce kůže „fish tank granuloma“	LJ + Ogawa	28-30	Aerobní	9 týdnů, dle potřeby prodloužit na 12	min. v intervalech 3, 6, 9 týdnů
Mikroskopicky pozitivní vzorek	LJ + Ogawa	28-30	Aerobní	4-6 týdnů	min. v intervalech 3, 6, 9 týdnů
Dále možno	LJ + Ogawa	28-30	Aerobní	9 týdnů, dle	min. v intervalech 3,

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 29/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

zvážít: BAL, kosti a punktáty (jen mikroskopicky pozitivní)				potřeby prodloužit na 12	6, 9 týdnů
<p>Pokud jsou pro kultivaci dekontaminovaného vzorku použity systémy s automatickým odečítáním, je nutno postupovat dle doporučení výrobce.</p> <p>Pro záchyt některých druhů výrazně pomalu rostoucích, kultivačně náročných mykobakterií, může být kultivační médium obohaceno dalšími doplňky (<i>M. haemophilum</i> – hemin)</p> <p>Pozn.: V některých případech je vhodné využití molekulárně biologických testů, viz 2.5.</p>					

### 3. Identifikace

Provádí se u každého izolátu z pevné půdy, nebo tekutého média u prvního záchytu neevidovaného pacienta. Opakované izoláty je možno rovněž identifikovat.

#### Minimální úroveň identifikace

Minimálně určení rodu *Mycobacterium*. Izolát z alespoň jednoho kultivačního média u každého nově vyšetřovaného pacienta by měl být identifikován na úroveň druhu/komplexu.

#### Identifikace mykobakterií

##### Minimum

##### Předběžné zhodnocení

- a) Makroskopické: na základě vzhledu kolonií v tekutém a/nebo pevném médiu (lépe se hodnotí na pevném, v tekutém hůře), pigmentace, charakter kolonií, rychlost růstu.
- b) Mikroskopické: po obarvení nátěru karbolfuchsinem (viz 2.3.3).  
Při vyloučení kontaminace nespecifickou flórou se ověření přítomnosti ART považuje se za potvrzení rodu *Mycobacterium*. Některé morfologické znaky jsou druhově specifické  
a umožňují rychlé screeningové odlišení NTM.

##### Cílená identifikace mykobakterií *M. tuberculosis* komplexu a *M.kansasii*

- a) Fotochromogenita, hydrolýza tweenu, redukce nitrátu, niacinový test.
- b) Imunochromatografický stripový test - detekce MPT 64 antigenu.

##### Nástavba

- a) Rychlá druhová identifikace hybridizací se značenou sondou.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 30/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

- b) Identifikace mykobakterií PCR amplifikací genomu s reverzní hybridizací.
- c) Cílená identifikace MALDI-TOF - použitelné, dosud adekvátně nevalidováno.

#### Doplňkové

- a) Podrobná fenotypová identifikace - morfologie, růstové vlastnosti, biochemie – vzhledem k pracnosti, časové náročnosti a nejednoznačnosti výsledku je již v rutíně od těchto metod ustupováno, nadále je možno fenotypové metody využít jako doplněk k systematickým studiím. Pro podrobnou a přesnou identifikaci jsou v současnosti využívány molekulárně biologické metody.
- b) Identifikace sekvenací – 16S RNA, dsHsP45 - jen u klinicky opodstatněných izolátů.
- c) HPLC-FL - použitelné, dosud adekvátně nevalidováno.
- d) MIRU-VTNR, Spoligo (MTBC, NTM) - slouží pro epidemiologické účely.

## 4. Testování citlivosti

Testování lékové citlivosti se provádí u každého nově izolovaného kmene komplexu *M. tuberculosis* a dále v klinicky indikovaných případech u NTM. Při přetrvávající pozitivitě pacienta je vhodné po 3 či více měsících (nebo podle dohody s ošetřujícím lékařem) vyšetření citlivosti zopakovat.

Zjišťuje se citlivost na základní antituberkulotika – INH, RIF, EMB, PZA, STM a v případě polyrezistence i na další antibakteriální látky, především fluorochinolony (např. ofloxacin, ciprofloxacin), rifabutin, etionamid, claritromycin, aminoglykosidy (kanamycin, amikacin), capreomycin, clofazimin a cykloserin. U NTM lze zvolit pro testování i další antibakteriální látky.

Určování citlivosti se jako součást nadstavbové diagnostiky soustředí do specializovaných mykobakteriologických laboratoří, které při kontrolách v systému externího hodnocení kvality (EHK) trvale dosahují uspokojivých výsledků.

Při detekci rezistence ke kterémukoliv ze základních antituberkulotik je nutné ověřit tuto rezistenci další metodou.

### 4.1. Stanovení citlivosti komplexu *Mycobacterium tuberculosis*

#### 4.1.1. Proporční metoda dle Canettiho

Provádí se na Löwenstein-Jensenových vaječných půdách ve zkumavkách.

Nejčastěji se tímto testem určuje citlivost na základní antituberkulotika: INH, RIF, EMB, PZA, STM.

Principem je porovnávání růstu mykobakterií na půdách s různými, tzv. kritickými, koncentracemi léků (viz níže) s růstem na kontrolních půdách bez léků. Kritická koncentrace léku představuje nejnižší koncentraci, která inhibuje "divoké" kmeny (tj. kmeny, které nikdy nebyly v kontaktu s antituberkulotikem), ale neinhibuje izoláty od pacientů, kteří nereagují na léčbu klinickým zlepšením.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 31/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

Odečet je možný po 3 - 4 týdnech inkubace, resp. podle růstu na kontrolních půdách bez léků při teplotě 37 °C.

V současnosti jsou obvykle používány půdy dodávané komerčně s již příslušně naředěnou kritickou koncentrací léků: INH - 0,2 mg/l, RIF - 40 mg/l, STM - 4 mg/l, EMB - 2 mg/l, PZA - 400 mg/l. Půdy je možné připravit individuálně a lze rozšířit i antibiotické spektrum. Nejčastěji se z dalších preparátů testují: kanamycin - 20 mg/l, cykloserin - 40 mg/l, capreomycin - 40 mg/l a etionamid - 40 mg/l (uvedeny jsou opět příslušné kritické koncentrace).

Vyjádření výsledku testu se odráží od tzv. kritické proporce (x %). Kritická proporce rezistentních zárodků je 1 %.

Definice rezistence při použití proporční metody je založena na skutečnosti, že úspěšnost klinické léčby je méně pravděpodobná, pokud víc než 1 % populace bakterií je při *in vitro* testování vůči léku odolná. Jakmile je tedy x % menší než 1 nebo se rovná 1, hodnotíme kmen jako citlivý. V případě, že x % je větší než 1, hodnotíme kmen jako rezistentní. Výsledek testu citlivosti není možné hodnotit u kmene, který dostatečně nevyrostl v kontrolách (tj. když i v nejvyšším očkovaném inokulu vyrostlo méně než 20 kolonií). Testování je pak třeba opakovat se silnějším inokulem.

#### 4.1.2. Metabolická metoda v uzavřeném systému

Výhodou metod založených na detekci produktů metabolismu rostoucích mykobakterií je jejich rychlost.

Principem je porovnávání růstu v kulturační zkumavce s antituberkulotikem s růstem v kontrolní zkumavce bez léku při teplotě 37 °C. Interpretace výsledků se provádí ve chvíli, kdy je pozitivní růstová kontrola.

Koncentrace léků a vlastní provedení metody se řídí doporučeným postupem výrobce.

#### 4.1.3. Metoda stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC)

Pro základní antituberkulotika se jedná o metodu doplňkovou, pro ostatní antituberkulotika je metodou volby. Vyšetření citlivosti na léky metodou stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) se provádí zejména u kmenů *M. tuberculosis* rezistentních na léky první řady.

Laboratoř je povinna tuto metodu validovat a verifikovat.

#### 4.1.4. Molekulárně biologické metody – detekce mutací

Jde o amplifikační genetické metody založené na detekci specifické mutace spojené s lékovou rezistencí. Umožňují rychlou diagnostiku rezistentní tuberkulózy a tím i rychlejší zahájení adekvátní léčby.

Některé testy (přímé) pracují přímo se vzorkem, jiné (nepřímé) slouží k analýze mykobakteriálního genomu z vykultivovaného izolátu.

Výsledek genetických metod je nutné konfirmovat s některou z fenotypových metod testování citlivosti.

Velký pokrok představují přímé testy, umožňující získat výsledky během několika hodin včetně zjištění rezistence na některá AT.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 32/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

## 4.2. Stanovení citlivosti u netuberkulózních, tj. podmíněně patogenních, mykobakterií (NTM)

Citlivost podmíněně patogenních mykobakterií se testuje pouze v klinicky indikovaných případech.

### 4.2.1. Proporční metoda dle Canettiho

Princip viz 4.1.1.

Kultivace probíhá při teplotě dle růstového optima konkrétního druhu (např. *M. marinum*, *M. chelonae* při teplotě 28-30 °C, *M. avium* při 42 °C, *M. xenopi* při 45 °C).

Hodnotí se po uplynutí časového intervalu vyplývajícího z doby růstu konkrétního druhu, především podle růstu na kontrolních půdách bez léku.

### 4.2.2. Metoda minimálních inhibičních koncentrací (MIC)

Touto metodou můžeme v 96jamkových mikrotitračních destičkách testovat širší spektrum antibiotik a chemoterapeutik.

Pro stanovení citlivosti na antituberkulotika u NTM je metodou volby.

### 4.2.3. Metoda E- testů

Dosud nebylo adekvátně validováno.

## 4.3. Využití referenční laboratoře nebo jiné laboratoře prokazatelně akreditované a opakovaně úspěšné v EHK

Pokud laboratoř provádí jen základní vyšetření materiálu na přítomnost mykobakterií, může následná vyšetření postoupit Národní referenční laboratoři pro mykobakterie (NRL) nebo laboratoři, která tato vyšetření provádí.

- Vzorky by měly být do takové laboratoře zasílány v adekvátních alikvotách kultur. Alikvotu kultury také uchovává původní laboratoř až do vydání závěrečného výsledku. Pro tato vyšetření je též nutný dostatečný nárůst kultury.

- Čisté kultury určené pro identifikaci a stanovení citlivosti by měly být expedovány co nejdříve od potvrzení positivity vzorku.

- Pokud je používán automatický kultivační systém, pozitivní kultury by měly být před odesláním ještě asi 48 hodin inkubovány, aby bylo dosaženo dostatečného objemu biomasy (kolonií) pro další zpracování.

[i\\_F\\_Seznam měřidel a zařízení, F\\_Karta měřicího prostředku.](#)

## POSTANALYTICKÁ FÁZE VYŠETŘENÍ

### 5. Hlášení výsledků

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 33/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

### 5.1. Mikroskopie

Hlášena je přítomnost/nepřítomnost acidorezistentních tyčinek

#### Doba odezvy

Pozitivní výsledek nově vyšetřovaného pacienta se hlásí bezprostředně po zjištění ošetřujícímu lékaři.

### 5.2. Kultivace

#### Pozitivní

Zachyceno *Mycobacterium sp.*/Kultivace na mykobakterie pozitivní

- popřípadě doplnit komentář (např. o orientační identifikaci NTM)

#### Negativní

Mykobakterie nenalezeny/Kultivace na mykobakterie negativní

#### Znečištěno

- popřípadě doplnit komentář (např. doporučení opakování odběru)

#### Doba odezvy

První záchyt MTBC u nových pacientů a výsledky urgentních vyšetření se hlásí ihned.

Vydávání negativních výsledků kultivace v automatických systémech dle pokynů výrobce.

Výsledky kultivace za 6 týdnů, v případě pozdější positivity v době jejího zjištění (obvykle za 9 - 12 týdnů)

### 5.3. Testování citlivosti

Výsledek testu citlivosti se u každého testovaného antituberkulotika vyjadřuje hodnocením citlivý/rezistentní. V případě stanovení MIC se u každého testovaného antituberkulotika uvádí zjištěná hodnota MIC a slovní hodnocení citlivý/rezistentní.

#### Doba odezvy

Výsledek stanovení citlivostí MTBC na první řadu antituberkulotik (INH, RIF, PZA, EMB, STM) by měl být k dispozici do 30 dnů od zjištění pozitivní kultivace.

U NTM závisí doba odezvy na druhu mykobakteria a době jeho růstu.

[PP Pracovní postup očkování kultivačních médií.](#)

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 34/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	NSVP_6
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

## 6. Povinné hlášení pozitivních výsledků

### Informační systém bacilární tuberkulózy (ISBT)

Celonárodní laboratorní databáze ISBT20xx! slouží k zadávání, editaci, vyhodnocení a exportu/importu dat o mykobakteriologických vyšetřeních prováděných na území České republiky.

Každá laboratoř provádějící mykobakteriologická vyšetření je povinna hlásit všechny pozitivní nálezy těchto vyšetření v elektronické formě pomocí programu ISBT. Hlášení se provádí jednou měsíčně kumulativním způsobem ve stanovených termínech, v současné době se zasílá do Národní jednotky dohledu nad TBC.

Klinicky signifikantní izoláty e hlásí místnímu ZÚ.

[Povinná hlášení dle Vyhl.MZ ČR č.473/2008 Sb., ve znění vyhlášek č.275/2010 Sb. A č.233/2011 Sb](#)

## 7 Materiální, technické a personální zabezpečení

[F\\_Seznam dokumentů](#), [F\\_Seznam knih](#)

### 7.1 Personál

Osoby oprávněné podle Pracovní náplně, Instrukcí o zpracování materiálu a platné dokumentace pro příslušnou laboratoř.

[F\\_Odborné kompetence](#), [F\\_Plán školicích akcí](#), [F\\_Seznam zaměstnanců OLMÍ](#), [F\\_Plán rozdělení laborantek](#)

### 7.2.Přístroje a pomocná zařízení

viz Příloha 2

[F\\_Seznam měřidel a zařízení](#), [F\\_Karta měřícího prostředku](#), [SOP\\_vyšetření citlivosti na antibiotika](#), [PP\\_Pracovní postup hodnocení diskového difusního testu s přístrojem Visor](#), [PP\\_Pracovní postup identifikace s použitím přístroje MALDI-TOF](#),

### 7.3 Metrologická návaznost, kalibrace metody Pouze tam,kde je to relevantní, kalibrace měřícího zařízení

[F\\_Seznam měřidel a zařízení](#), [F\\_Karta měřícího prostředku](#)

### 7.4.Chemikálie, reagentie a spotřební materiál (tabulka)

**Reagentie:** lahvičky/zkumavky do metabolických systémů

**Výrobce1:** Becton Dieckinson, bioMerieux,Trek Diagnostic Systems

[PP\\_Pracovní návod k obsluze přístroje](#)

[F\\_Příjem chemikálií](#), [F\\_Seznam dodavatelů](#), [F\\_Nové šarže k testování](#)

### 7.5.Prostory

[F\\_Seznam dokumentů](#), [F\\_Seznam knih](#), [F\\_Záznam o úklidu 1](#), [F\\_Záznam o úklidu 2](#), [PR\\_Denní nakládání s odpadem](#), [F\\_Odpolední služby](#), [F\\_Služby - víkend, svátek](#), [F\\_Plán letních dovolených](#), [F\\_Plán zimních dovolených](#)

## 8.Systém kontroly kvality

Interní kontrola kvality odečtu a interpretace nálezu

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 35/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

[F\\_porovnávací kontrola odečítajících.](#)

Interní kontrola kultivačních pūd ,

[S\\_Seznam kontrolních kmenů.](#) [F\\_Evidence šarží – pūd.](#) [F\\_výsledky kontroly růstu.](#)  
[PP\\_oživování a konzervování sbírkových referenčních kmenů a provedení interní kontroly kvality ATB disků a identifikačních testů – příloha 1 – Seznam referenčních sbírkových kmenů](#)

Interní kontrola identifikace

[S\\_Seznam kontrolních kmenů.](#) [F\\_Záznamy kontrol identifikace fenotypovou metodou.](#)  
[F\\_Evidence šarží diagnostik – identifikace.](#) [F\\_Záznamy kontrol identifikace metodou MALDI-TOF.](#)

Interní kontrola vyšetření citlivosti na antituberkulotika Interní kontroly, postupy, Seznam kontrolních kmenů.

[F\\_IHK – Záznamy inhibičních zón kontrolních kmenů.](#) [F\\_kontrola expirace disků.](#) [F\\_kontrola růstu na testovacích pūdách.](#) [S-Seznam kontrolních kmenů a inhibičních zón dle EUCAST a Urbášková.](#) [F\\_Evidence šarží disků– citlivosti.](#)

Externí kontrola EHK, certifikáty, viz archivované výsledky EHK, Plán EHK.

[D\\_plán EHK.](#) [S\\_seznam smluvních laboratoří \(NRL\).](#) [F\\_Záznam ranních hlášení s projednáním výsledků EHK.](#) [K\\_EHK – bakteriologie \(archivace výsledků\).](#) [K\\_NRL - uchování kmenů kmenů při – 70°C \(uchovávání kmenů z EHK\).](#) [F\\_Zkouška nových vzorků.](#) [F\\_Záznam o neshodě \(prevenci\).](#) [F\\_Protokol interního auditu.](#) [F\\_Program auditu.](#) [F\\_Přezkoumání systému managementu vedením.](#) [F\\_Seznam neshod](#)

## 9. Validace a verifikace

Prováděné SOP jsou validovány údaji v recenzované literatuře a Národních SOP (viz. Literatuře) a jsou verifikovány v rámci EHK v nichž se laboratoř účastní a pomocí IHK a IKK viz odkazy:

**Dokumenty SLM ČLS JEP platné pro NASKL a ČIA:**

[http://www.splm.cz/dokumenty/PSSLP\\_2.pdf](http://www.splm.cz/dokumenty/PSSLP_2.pdf),

[http://www.splm.cz/dokumenty/PS\\_VALVER.pdf](http://www.splm.cz/dokumenty/PS_VALVER.pdf) , QSOP 2\_interní kontrola kvality v klinické mikrobiologii

## 10. Související dokumentace

[ED\\_Povinná hlášení dle Vyhl.MZ ČR č.473/2008 Sb., ve znění vyhlášek č.275/2010 Sb. A č.233/2011 Sb](#)

[K\\_Kniha hlášek a pravděpodobných nozokomiálních kmenů](#)

[K\\_Kmeny zaslané do NRL.](#)

[LP\\_Laboratorní příručka](#)

[MP\\_neshody na příjmu a jejich řešení.](#)

[MP\\_Identifikace vzorků](#)

[MP\\_LIS](#)

[MP\\_Uchování vzorků](#)

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 36/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

[MP\\_Manipulace s infekčním odpadem.](#)

[MP\\_Expedice výsledků](#)

[MP\\_Aktivní hlášení pozitivních výsledků \(priority, kritické výsledky\).](#)

[MP\\_Příjem a skladování vzorku v laboratoři.](#)

[MP\\_Rozdělování expedovaných papírových výsledků.](#)

[PK\\_Příručka kvality](#)

[MP\\_Příjem materiálu](#)

[PP\\_Pracovní postup očkování kultivačních médií.](#)

[PP\\_Svoz biologického materiálu a rozvoz výsledků a odběrového materiálu.](#)

[PP\\_Zpracování výtěru na GO](#)

[PR\\_Provozní řád.](#)

[MP\\_Manipulace s infekčním odpadem,](#)

[S\\_osoby oprávněné k uvolňování a validaci výsledků pro tisk a expedici.](#)

[QSOP\\_1\\_Rízení dokumentů a záznamů](#)

[BSOPID\\_1 Obecné zásady identifikace medicínsky významných bakterií.](#)

[SOPTP\\_1 - Vyšetřování citlivosti na antibiotika semikvantitativním difusním testem, kvantitativní diluční mikrometodou a metodou E-test](#)

## 12. Literatura

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 37/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

1. National Institute for Health and Clinical Excellence 2011. Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. <http://guidance.nice.org.uk/CG117/NICEGuidance/pdf/English>.
2. Department of Health 2007. Tuberculosis prevention and treatment: a toolkit for planning, commissioning and delivering high-quality services in England. [http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH\\_075621](http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_075621).
3. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:3684-9.
4. Parsons LM, Somoskovi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. Clin Microbiol Rev 2011;24:314-50.
5. van Soolingen D, van der Zanden AG, de Haas PE, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraïne NA, et al. Diagnosis of Mycobacterium microti infections among humans by using novel genetic markers. J Clin Microbiol 1998;36:1840-5.
6. Gibney KB, MacGregor L, Leder K, Torresi J, Marshall C, Ebeling PR, et al. Vitamin D deficiency is associated with tuberculosis and latent tuberculosis infection in immigrants from sub-Saharan Africa. Clin Infect Dis 2008;46:443-6.
7. Ustianowski A, Shaffer R, Collin S, Wilkinson RJ, Davidson RN. Prevalence and associations of vitamin D deficiency in foreign-born persons with tuberculosis in London. J Infect 2005;50:432-7.
8. Abel, L, Sanchez, FO, Oberti, J, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP<sup>1</sup> gene. J. Infect. Diseases, 1998; 77: 133-45.
9. Tuberculosis Coalition for Technical Assistance International Standards for Tuberculosis Care (ISTC), second edition. The Hague: Tuberculosis Coalition for Technical Assistance; 2009.
10. American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1376-95.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Treatment of tuberculosis. MMWR Recomm Rep 2003;52(RR-11):1-77.
12. Migliori GB, Zellweger JP, Abubakar I, Ibraim E, Caminero JA, De Vries G, et al. European Union standards for tuberculosis care. Eur Respir J 2012;39:807-19.
13. Narayanan S. Molecular epidemiology of tuberculosis. Indian J Med Res 2004;120:233-47.
14. Mase SR, Ramsay A, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Cunningham J, et al. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis 2007;11:485-95.
15. Patwardhan SA, Bhargava P, Bhide VM, Kelkar DS. A study of tubercular lymphadenitis: A comparison of various laboratory diagnostic modalities with a

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 38/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

special reference to tubercular polymerase chain reaction. Indian J Med Microbiol 2011;29:389-94.

16. Fontanilla JM, Barnes A, von Reyn CF. Current diagnosis and management of peripheral tuberculous lymphadenitis. Clin Infect Dis 2011;53:555-62.
17. Roberts DS, Dowdall JR, Winter L, Sulis CA, Grillone GA, Grundfast KM. Cervical tuberculosis: a decision tree for protecting healthcare workers. Laryngoscope 2008;118:1345-9.
18. Schaad UB, Votteler TP, McCracken GH, Jr., Nelson JD. Management of atypical mycobacterial lymphadenitis in childhood: a review based on 380 cases. J Pediatr 1979;95:356-60.
19. Lindeboom JA, Kuijper EJ, Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom R, Prins JM. Surgical excision versus antibiotic treatment for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children: a multicenter, randomized, controlled trial. Clin Infect Dis 2007;44:1057-64.
20. Jacob JT, Mehta AK, Leonard MK. Acute forms of tuberculosis in adults. Am J Med 2009;122:12-7.
21. Thwaites G, Fisher M, Hemingway C, Scott G, Solomon T, Innes J. British Infection Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children. J Infect 2009;59:167-87.
22. Rasheed S, Zinicola R, Watson D, Bajwa A, McDonald PJ. Intra-abdominal and gastrointestinal tuberculosis. Colorectal Dis 2007;9:773-83.
23. Marshall JB. Tuberculosis of the gastrointestinal tract and peritoneum. Am J Gastroenterol 1993;88:989-99.
24. Figueiredo AA, Lucon AM. Urogenital tuberculosis: update and review of 8961 cases from the world literature. Rev Urol 2008;10:207-17.
25. Wise GJ, Shteynshlyuger A. An update on lower urinary tract tuberculosis. Curr Urol Rep 2008;9:305-13.
26. Cek M, Lenk S, Naber KG, Bishop MC, Johansen TE, Botto H, et al. EAU guidelines for the management of genitourinary tuberculosis. Eur Urol 2005;48:353-62.
27. Abou-Raya S, Abou-Raya A. Spinal tuberculosis: overlooked? J Intern Med 2006;260:160-3.
28. Yao DC, Sartoris DJ. Musculoskeletal tuberculosis. Radiol Clin North Am 1995;33:679-89.
29. Slavin RE, Walsh TJ, Pollack AD. Late generalized tuberculosis: a clinical pathologic analysis and comparison of 100 cases in the preantibiotic and antibiotic eras. Medicine (Baltimore) 1980;59:352-66.
30. Bouza E, Diaz-Lopez MD, Moreno S, Bernaldo de Quiros JC, Vicente T, Berenguer J. Mycobacterium tuberculosis bacteremia in patients with and without human immunodeficiency virus infection. Arch Intern Med 1993;153:496-500.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 39/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

31. Shafer RW, Goldberg R, Sierra M, Glatt AE. Frequency of Mycobacterium tuberculosis bacteremia in patients with tuberculosis in an area endemic for AIDS. Am Rev Respir Dis 1989;140:1611-3.
32. Archibald LK, den Dulk MO, Pallangyo KJ, Reller LB. Fatal Mycobacterium tuberculosis bloodstream infections in febrile hospitalized adults in Dar es Salaam, Tanzania. Clin Infect Dis 1998;26:290-6.
33. Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX, Wynne BA. Incidence of Mycobacterium avium-intracellulare complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. J Infect Dis 1992;165:1082-5.
34. Pettipher CA, Karstaedt AS, Hopley M. Prevalence and clinical manifestations of disseminated Mycobacterium avium complex infection in South Africans with acquired immunodeficiency syndrome. Clin Infect Dis 2001;33:2068-71.
35. IKarakousis PC, Moore RD, Chaisson RE. Mycobacterium avium complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. Lancet Infect Dis 2004;4:557-65.
36. Sougakoff W. Molecular epidemiology of multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. Clin Microbiol Infect 2011;17:800-5.
37. Dheda K, Warren RM, Zumla A, Grobusch MP. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management challenges. Infect Dis Clin North Am 2010;24:705-25.
38. Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, Jacobs WR, Jr., et al. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. Lancet 1994;344:293-8.
39. Centers for Disease Control. Notice to Readers: Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. Morbidity and Mortality Weekly Report. MMWR 2006;55:1176.
40. Udawadia ZF, Amale RA, Ajbani KK, Rodrigues C. Totally drug-resistant tuberculosis in India. Clin Infect Dis 2012;54:579-81.
41. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of non-tuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:367-416.
42. Bhambri S, Bhambri A, Del Rosso JQ. Atypical mycobacterial cutaneous infections. Dermatol Clin 2009;27:63-73.
43. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev 2003;16:319-54.
44. Turenne CY, Wallace R, Jr., Behr MA. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin Microbiol Rev 2007;20:205-29.
45. Ispahani P, Baker M. Mycobacterial culture: how long? Lancet 1988;1:305.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 40/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

46. van der Werf TS, Stienstra Y, Johnson RC et al . Mycobacterium ulcerans disease. Bulletin of the World Health Organization. [http://www.scielo.org/scielo.php?pid=S0042-96862005001000016&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org/scielo.php?pid=S0042-96862005001000016&script=sci_arttext). p. 785-791.
47. Varadi RG, Marras TK. Pulmonary Mycobacterium xenopi infection in non-HIV-infected patients: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis 2009;13:1210-8.
48. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev 2002;15:716-46.
49. Getahun H, Gunneberg C, Granich R, Nunn P. HIV infection-associated tuberculosis: the epidemiology and the response. Clin Infect Dis 2010;50 Suppl 3:S201-S207.
50. Crofts JP, Gelb D, Andrews N, Delpech V, Watson JM, Abubakar I. Investigating tuberculosis trends in England. Public Health 2008;122:1302-10.
51. Barry CE, III, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. Nat Rev Microbiol 2009;7:845-55.
52. Backx M, Curtis H, Freedman A, Johnson M. British HIV Association national audit on the management of patients co-infected with tuberculosis and HIV. Clin Med 2011;11:222-6.
53. Taggart EW, Hill HR, Ruegner RG, Martins TB, Litwin CM. Evaluation of an in vitro assay for gamma interferon production in response to Mycobacterium tuberculosis infections. Clin Diagn Lab Immunol 2004;11:1089-93.
54. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K. Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection - United States, 2010. MMWR Recomm Rep 2010;59:1-25.
55. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. Ann Intern Med 2008;149:177-84.
56. Balasingham SV, Davidsen T, Szpinda I, Frye SA, Tonjum T. Molecular diagnostics in tuberculosis: basis and implications for therapy. Mol Diagn Ther 2009;13:137-51.
57. Sam IC, Drobniewski F, More P, Kemp M, Brown T. Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance, United Kingdom. Emerg Infect Dis 2006;12:752-9.
58. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. J Clin Microbiol 2011;49:1202-5.
59. Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, Sharp SE, Momeny MA, Babst A, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. J Clin Microbiol 2011;49:1621-3.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 41/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

60. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:787-92.
61. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol* 2003;94:781-91.
62. Allix-Beguec C, Fauville-Dufaux M, Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2008;46:1398-406.
63. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998;144 ( Pt 5):1189-96.
64. Burman WJ, Reeves RR. Review of false-positive cultures for Mycobacterium tuberculosis and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin Infect Dis* 2000;31:1390-5.
65. Collyns TA, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM. Molecular Fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis: does it help in understanding the epidemiology of tuberculosis? *Reviews in Medical Microbiology* 2002;13:119-27.
66. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011;49:1790-4.
67. Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, Dauphin B, Carbonnelle E, Guet-Revillet H, et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48:4481-6.
68. Ganoza CA, Ricaldi JN, Chauca J, Rojas G, Munayco C, Agapito J, et al. Novel hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) method for decontamination and concentration of sputum samples for Mycobacterium tuberculosis microscopy and culture. *J Med Microbiol* 2008;57:1094-8.
69. Padilla E, Manterola JM, Gonzalez V, Thornton CG, Quesada MD, Sanchez MD, et al. Comparison of the sodium hydroxide specimen processing method with the C18-carboxypropylbetaine specimen processing method using independent specimens with auramine smear, the MB/BacT liquid culture system, and the COBAS AMPLICOR MTB test. *J Clin Microbiol* 2005;43:6091-7.
70. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006;6:570-81.
71. Murray SJ, Barrett A, Magee JG, Freeman R. Optimisation of acid fast smears for the direct detection of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Pathol* 2003;56:613-5.
72. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. *MMWR Surveill Summ* 2012;61:1-102.

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 42/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

73. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.
74. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
75. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
76. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. [http://www.dft.gov.uk/426155/425453/800\\_300/infectioussubstances.pdf](http://www.dft.gov.uk/426155/425453/800_300/infectioussubstances.pdf).
77. Good RC, Silcox V, Kilburn JO. Tuberculosis and other Mycobacterioses. In: Balows A, Hausler WJ Jr, editors. Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections. 6th ed. American Public Health Association; 1981. p. 675-703.
78. Wallis CK. Mycobacteriology. Specimen Collection and Transport. In: Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook.Vol 1. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1992. p. 3.2.1-3.2.6.
79. Parrish NM, Carroll KC. Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. J Clin Microbiol 2011;49:772-6.
80. Watt B, Rayner A, Harris G. Mycobacterium. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, editors. Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. p. 329-41.
81. Yan JJ, Huang AH, Tsai SH, Ko WC, Jin YT, Wu JJ. Comparison of the MB/BacT and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2000;37:25-30.
82. Johansen IS, Thomsen VO, Marjamaki M, Sosnovskaja A, Lundgren B. Rapid, automated, nonradiometric susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex to four first-line antituberculous drugs used in standard short-course chemotherapy. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;50:103-7.
83. Drobniowski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. Lancet Infect Dis 2003;3:141-7.
84. Gelbičová T., Koudelková S., Pravidla pro přepravu mikroorganismů. Zprávy CEM (SZÚ Praha) 2012;21(4):157-161.

## 12. Definice, terminologie a zkratky

ART - acidorezistentní tyčky

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EHK – externí hodnocení kvality

EMB – etambutol

FR - fyziologický roztok

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 43/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

IGRA - interferon gamma release assay

INH - isoniazid

ISBT - informační systém bacilární tuberkulózy

LJ - Löwenstein-Jensenova půda

LTBI - latentní tuberkulózní infekce

LV - laryngeální výtěr

MAIC - *Mycobacterium avium- intracellulare* komplex

MDR-TB - multirezistentní tuberkulóza

MIC - minimální inhibiční koncentrace

MTBC - *Mycobacterium tuberculosis* komplex

MTBC - mykobakterie skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex

NALC - N-acetyl-L-cystein

NK - nukleová kyselina

NTM - netuberkulózní mykobakterie

PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

PZA - pyrazinamid

RIF - rifampicin

RNA - ribonukleová kyselina

SDV - sterilní destilovaná voda

STM - streptomycin

TBC - tuberkulóza

TDR-TB - totálně rezistentní tuberkulóza

XDR-TB - extenzivně rezistentní tuberkulóza

ZN – Ziehl-Neelsen)

### 13. Rozdělovník

[Elektronické úložiště dat ONTU, řízená dokumentace SOP u vrchní laborantky, pracovní postupy a knihy podle laboratoří. Zpracování materiálu laboratoř klinická.](#)

### 14. Související záznamy

[F\\_ Seznam oprávnění pracovníků podle SOP.](#)

[F\\_ Evidence šarží - půdy](#)

[F\\_ Evidence šarží diagnostik – identifikace.](#)

[F\\_ Evidence šarží disků– citlivosti.](#)

[F\\_ Plán rozdělení laborantek](#)

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 44/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------

	<b>Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP</b>	<b>NSVP_6</b>
<b>Název: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění</b>		
Verze: 1	Platné od: 30.5.2014	

[ED\\_Seznam právních předpisů - zdravotnictví – 473/2008 Vyhláška o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce, se změnami č.275/2010 – platná od 12.10.2010 a č. 233/2011 Sb. S platností od 5.8. 2011, LP žádanka o vyšetření](#)

## 15. Přílohy

Verze: 1 Výtisk č.: 1	Zpracoval: doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.	Kontroloval:	Schválil:	Str. 45/45 Změna str.: -
--------------------------	--	--------------	-----------	-----------------------------