

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Plzni
Ústav mikrobiologie

*Studijní program: Doktorský studijní program v biologii a medicíně
kombinované studium*

DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Molekulárně-epidemiologická analýza kmenů
Mycobacterium tuberculosis izolovaných na území
Plzeňského kraje včetně detailní charakterizace
kmenů rezistentních na antituberkulóza**

**Molecular-epidemiological analysis of
Mycobacterium tuberculosis strains isolated in the
West-Bohemian Region of the Czech Republic
including detailed characterisation of
antituberculosis drugs – resistant strains**

MUDr. Jana Amlerová

Školitel: doc. Ing. Jaroslav Hrabák Ph.D.

Plzeň 2019

Název: Molekulárně-epidemiologická analýza kmenů *Mycobacterium tuberculosis* izolovaných na území Plzeňského kraje včetně detailní charakterizace kmenů rezistentních na antituberkulotika

Název anglicky: Molecular-epidemiological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in the West-Bohemian Region of the Czech Republic including detailed characterisation of anti-tuberculosis drugs – resistant strains

Autor: MUDr. Jana Amlerová

Pracoviště: Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta UK v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň

Adresa pracoviště: Edvarda Beneše 1128/13, 305 99 Plzeň-Bory

Adresa fakulty: Husova 3, 301 00 Plzeň

Školitel: doc. Ing. Jaroslav Hrabák Ph.D.

Studijní program: Doktorský studijní program v biologii a medicíně, kombinované studium

Obor: Hygiena, preventivní lékařství a epidemiologie

Rok vydání: 2019

Místo vydání: Plzeň

Počet číslovaných stran: 144

Počet obrázků: 10

Počet tabulek: 7

Počet příloh: 7

Počet citovaných zdrojů: 219

Klíčová slova: tuberkulóza – *Mycobacterium tuberculosis* – genotypizace – WGS – rezistence

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací. Jakákoliv reprodukce práce (včetně mechanického, elektronického, fotografického nebo jiného záznamu) je možná pouze po předchozím souhlasu autora a při zachování pravidel citace zdrojů.

V Plzni dne 20. 6. 2019

.....
Jana Amlerová

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. Ing. Jaroslavu Hrabákovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, práci v tvůrčím kolektivu a podporu v průběhu studia. Děkuji také za moje uvedení do oboru molekulární genetiky.

Děkuji celému kolektivu laboratoře antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii Biomedicínského centra LF UK v Plzni za pomoc a spolupráci. Zejména děkuji dr. Ibrahimu Bitarovi, Ph.D., Mgr. Kateřině Chudějové, Ph.D. a Daně Králové, DiS.

Děkuji celému kolektivu Ústavu mikrobiologie FN Plzeň za podporu.

Abstrakt

Tuberkulóza je kontagiózní infekční onemocnění, které představuje celosvětově velký epidemiologicko-klinický problém. Incidence tuberkulózy se v různých oblastech světa výrazně liší, ale i země s nízkou incidencí se epidemiologii tuberkulózy významně věnují. Ve světovém měřítku je tuberkulóza jednou z priorit WHO, spolupráce probíhá na mezinárodní úrovni. Protože je tuberkulóza tzv. sociální nemocí, patří země s vysokým výskytem tuberkulózy mezi země rozvojové. Především v Africe situaci významně komplikuje koincidence tuberkulózy a HIV. V rámci střední Evropy se incidence tuberkulózy pohybuje na nízké úrovni, Česká republika patří mezi země s nejnižší incidencí vůbec. V posledních letech se u nás pohybuje incidence těsně pod 5 novými případy na 100 000 obyvatel za rok. Tato situace je mimo jiné také výsledkem vysoké úrovně surveillance tuberkulózy a aplikací účinných epidemiologických opatření s oporou v legislativě.

Předkládaná dizertační práce se věnuje několika oblastem problematiky tuberkulózy s hlavním zaměřením na moderní možnosti laboratorní diagnostiky a především na moderní metody molekulárně-epidemiologické analýzy. Obsahuje rešerši recentní odborné literatury týkající se molekulárně-genetické diagnostiky a tyto poznatky aplikuje na výběr nejhodnější dostupné metody pro genotypizaci izolátů *Mycobacterium tuberculosis*, která by byla vhodná pro zavedení do praxe. Závěrem výzkumu je definování celogenomové sekvenace (WGS) jako metody volby pro molekulárně-epidemiologické analýzy výskytu a šíření tuberkulózy. Součástí práce je uvedení přehledu známých genotypů *M. tuberculosis* včetně jejich geografického rozšíření a popsání principu stanovení těchto genotypů a jejich detekce. Ve výsledcích výzkumu souboru kmenů izolovaných od pacientů s tuberkulózou na území ČR je popsána podrobná metodika použité metody WGS, vyhodnocení získaných údajů a přehled genotypů *M. tuberculosis*, které byly u těchto nemocných zachyceny. Tento postup je možné v budoucnu ve spolupráci s dalšími laboratořemi aplikovat na všechny izoláty získané na území ČR v určitém období. Tyto informace pak mohou vést ke znalosti způsobu šíření tuberkulózy mezi lidmi, ke znalosti okolností importu tohoto onemocnění ze zahraničí a také po příslušném vyhodnocení k zavedení účinných epidemiologických opatření.

Téma laboratorní diagnostiky tuberkulózy je v dizertační práci zaměřeno na identifikaci metodou hmotnostní spektrometrie, která v současné době patří mezi nejmodernější identifikační postupy v celé mikrobiologii a kterou lze s výhodou aplikovat i na identifikaci mykobakterií. Výsledky se opírají o vlastní výzkum a také o výsledky mezinárodního výzkumu, kterého se FN Plzeň a Biomedicínské centrum LF UK v Plzni účastnily.

Diagnostika latentní tuberkulózy nabývá v posledních letech na významu z několika důvodů. Jednak epidemiologických ve smyslu vyhledávání onemocnění u kontaktů s aktivní formou tuberkulózy, dále u pacientů s oslabením buněčné imunity, tedy především pacientů před nebo na biologické léčbě preparáty typu blokátorů TNF alfa, a v neposlední řadě například u pacientů s primárním plicním onemocněním (nádory, cystická fibróza, intersticiální plicní procesy atd.). Diagnostika této formy

tuberkulózy je v práci prezentována zaměřením na metody IGRA. Tyto metody jsou v současnosti nejspolehlivějším způsobem detekce latentní tuberkulózy. V práci jsou porovnány dvě dostupné metody – Quantiferon TB Gold Plus a T-SPOT.TB. Výsledky jsou vyhodnoceny porovnáním obou metod a je navržen vhodný postup, jak a kdy každou z těchto metod volit v rutinní diagnostice.

Diagnostika a zejména epidemiologické analýzy tuberkulózy prodělávají v posledních letech podobně jako celá mikrobiologie rychlý vývoj. Přesto ale stále jde o metody, které celé diagnostické spektrum doplňují, ale nenahrazují. Standardními postupy v diagnostice tuberkulózy zůstávají klasické metody přímého průkazu jako mikroskopie a kultivace. Je žádoucí moderní postupy plně využít, ale je nutné mít neustále na paměti, že hodnocení a interpretace výsledků jakýchkoliv mikrobiologických laboratorních metod jsou plně závislé na okolnostech onemocnění každého individuálního pacienta, jeho stavu a kontextu s dalšími nálezy.

Abstract

Tuberculosis is contagious infectious disease that embodies significant epidemiological and clinical problem worldwide. Tuberculosis incidence differs considerably in various regions of the world but even the countries with low incidence engage strongly in epidemiology of tuberculosis. Tuberculosis belongs to one of the priorities of WHO, cooperation in this matter takes place on a global scale. Tuberculosis is a social illness, accordingly the countries with high occurrence of tuberculosis are classified as developing countries. Mainly in Africa, there is the situation being complicated by coexistence of HIV. Generally, Europe represents a region with low incidence of tuberculosis. The Czech Republic is a country with the lowest incidence in the world with less than five new cases per 100 000 inhabitants every year. This situation is among others result of high-level tuberculosis surveillance and effective application of epidemiological arrangements based in legislation.

This dissertation thesis examines several fields of tuberculosis, mainly focused on modern opportunities of laboratory diagnosis and most importantly modern methods of molecular-epidemiological analysis. It consists of review of recent literature related to molecular-epidemiological diagnostics and application of gained knowledge on selection of the most suitable available methods for genotyping of isolates *Mycobacterium tuberculosis*, which would be fitting for putting into practice. Final outcome of the thesis defines whole genome sequencing (WGS) as methods of choice for molecular epidemiological analysis of incidence and spreading of tuberculosis. Part of this thesis also represents overview of familiar genotypes *M. tuberculosis* including their geographical distribution and description of principle of designation of these genotypes and their detection. In the results section, research of strains group isolated from patients with tuberculosis isolated in the Czech Republic are described using WGS, appraisal of gained data and summary of *M. tuberculosis* genotypes that were present by infected patients. This method will be available to apply to all isolates obtained in the Czech Republic during given time period, assuming other laboratories cooperate in the future. This information can lead to discover a way of how tuberculosis spreads among people and how it can be imported from abroad, which could lead to implementing effective epidemiologic arrangements.

In this thesis, the topic of laboratory diagnostics of tuberculosis is focused on identification through mass spectrometry that belongs to the current modernest ways of identifications in microbiology and that can be applied on identification of mycobacteria. The results derive from separate research and international research, that FN Plzeň and Biomedical Center LF UK in Plzeň took part in.

In recent times, the importance of latent tuberculosis diagnosis is raising. The first reason is epidemiological searching for patients with active form of tuberculosis. There are also patients with weakened cell-mediated immunity, who are mostly patients before or during immunotherapy, which uses treatment on base of TNF alfa inhibitors and so on. Last but not least, patients with primary pulmonary disease such as tumors, cystic fibrosis, interstitial pulmonary process etc. Diagnosis of

this form of tuberculosis is in the paper presented by focus on IGRA methods. These methods are currently the most reliable way to detect latent tuberculosis. The thesis compares two available methods – Quantiferon TB Gold Plus and T-SPOT.TB. Results are built as comparison of both methods and there is described how, when and which one to use for routine diagnosis.

Similarly, to other fields of microbiology, diagnosis and epidemiological analysis of tuberculosis in particular develop lately very quickly. However, these methods are still only additional to the complet diagnostic spectrum, they do not replace it. Standard methods in diagnosis of tuberculosis remain classic methods like microscopy and cultivation. It is appropriate to fully utilize modern methods, nonetheless, the evaluation and interpretation of result of any microbiological laboratory method are dependent on circumstances of disease of individual patient, his condition and context with other findings.

Seznam zkratek

ART	acidorezistentní tyčinky
AT	antituberkulotikum
ATB	antibiotikum
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BP	break point
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOTS	Directly Observed Treatment Short Course
DR	direct repeat region
DVR	variabilní direct repeat region
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EMB	ethambutol
IGRA	interferon gamma Release assay
IS	inzerční sekvence
INH	izoniazid
ISBT	Informační systém bacilární TB
LPA	line probe assay
LSP	large sequence polymorphism
LTBI	latentní tuberkulóza
MDR	multi drug resistant
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MIRU	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
MOTT	mycobacteria others than tuberculosis
MPS	massive parallel sequencing
NGS	new generation sequencing
NTM	non tuberculosis mycobacteria
PCR	polymerase chain reaction
PGG	principal genetic group
PGRS	Polymorphic GC-rich repetitive sequence
PNE	pneumologie
PPD	purifikovaný proteinový derivát
PPM	potenciálně patogenní mykobakteria
PZA	pyrazinamid
QRDR	quinolone resistance-determining region
RD	region of difference
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
SNP	single nucleotid polymorphism
STM	streptomycin
TB	tuberkulóza
TCH	hydrazid 2thiofen-karboxylové kyseliny
TDR	totally drug resistant
TNF	tumor necrosis factor
TST	tuberculin skin test
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
VNTR	variabilní tandemové repetice – Variable Number Tandem Repeats
WHO	World Health Organisation
WGS	whole genome sequencing
XDR	extensively drug resistant

Obsah

1. Úvod	12
Cíle dizertační práce	13
2. Rod <i>Mycobacterium</i>	14
2.1. Historie	14
2.2. Druhy rodu <i>Mycobacterium</i>	14
3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
3.1. Taxonomické zařazení druhu	15
3.2. Komplex <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
3.3. Vlastnosti komplexu <i>M. tuberculosis</i>	16
3.4. Evoluce <i>Mycobacterium tuberculosis</i> komplex	18
3.5. Genetická charakteristika komplexu <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
3.5.1. Diferenciace druhů komplexu <i>M. tuberculosis</i> genetickými metodami	22
3.6. Charakteristika jednotlivých druhů komplexu <i>M. tuberculosis</i>	23
3.6.1. <i>Mycobacterium tuberculosis sensu stricto</i>	23
3.6.2. <i>Mycobacterium bovis</i>	26
3.6.3. <i>Mycobacterium africanum</i>	28
3.6.4. <i>Mycobacterium canetti</i>	29
3.6.5. <i>Mycobacterium caprae</i>	29
3.6.6. <i>Mycobacterium microti</i>	30
3.6.7. <i>Mycobacterium pinnipedii</i>	30
3.6.8. <i>Mycobacterium suricattae</i>	30
3.6.9. Další ekotypy	30
3.7. Tuberkulóza	31
3.7.1. Patogeneze a formy tuberkulózy	31
3.7.2. Klinický obraz aktivní tuberkulózy	31
3.7.3. Imunogenicita <i>M. tuberculosis</i>	32
3.7.4. Diagnostika tuberkulózy	32
3.7.5. Léčba tuberkulózy	32
3.7.6. Rezistence <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
3.7.7. Typy rezistence <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
4. Antituberkulotika a mechanismy jejich rezistence	37
4.1. Základní antituberkulotika	37
4.1.1. Streptomycin	38
4.1.2. Isoniazid	39
4.1.3. Rifampicin	41
4.1.4. Ethambutol	42
4.1.5. Pyrazinamid	44
4.2. Antituberkulotika a antibiotika druhé řady	45
4.2.1. Fluorochinolony	46
4.2.2. Injektabilní AT	47
4.2.3. Antituberkulotika s nižším účinkem	47
5. Epidemiologie tuberkulózy	49
5.1. Epidemiologie ve světě	49
5.2. Epidemiologie TB v České republice	49
5.3. Možnosti prevence TB a epidemiologická opatření	50
6. Laboratorní diagnostika tuberkulózy	52
6.1. Mikroskopický průkaz	52

6.2. Kultivace	52
6.3. Identifikace druhů	52
6.4. Stanovení citlivosti	52
6.5. Diagnostika latentní tuberkulózy	53
7. Molekulárně genetické metody k detekci a analýze <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
7.1. Genotypizace kmenů <i>M. tuberculosis</i>	54
7.1.1. IS6110 – RFLP	55
7.1.2. PGRS-RFLP	56
7.1.3. Spoligotyping	56
7.1.4. MIRU-VNTR	57
7.1.5. Další metody založené na PCR.....	58
7.1.6. Mutace spojené s rezistencí.....	58
7.1.7. Metody pro fylogenetickou analýzu	58
7.1.8. Celogenomová sekvenace	59
7.2. Genotypy <i>M. tuberculosis</i>	62
7.2.1. Haarlem	62
7.2.2. LAM (Latin America and Mediterranean).....	63
7.2.3. T lineage	63
7.2.4. X lineage	63
7.2.5. EAI (East African-Indian).....	63
7.2.6. CAS (Central Asian).....	63
7.2.7. Beijing	63
7.2.8. MANU	63
7.2.9. Linie S	63
7.3. Molekulárně epidemiologické studie.....	65
7.4. Možnosti detekce rezistence <i>M. tuberculosis</i> v rutinní laboratoři	65
8. Metodika	66
8.1. Identifikace mykobakterií hmotnostní spektrometrií.....	66
8.1.1. Soubor	66
8.2. Nepřímý průkaz TB metodami IGRA	67
8.2.1. Soubor.....	67
8.3. Genotypizace <i>M. tuberculosis</i>	67
8.3.1. Popis izolátů.....	68
9. Výsledky	69
9.1. Identifikace mykobakterií hmotnostní spektrometrií.....	69
9.2. Nepřímý průkaz TB metodami IGRA	69
9.3. Genotypizace <i>M. tuberculosis</i>	69
10. Diskuze	73
10.1. Identifikace mykobakterií hmotnostní spektrometrií	73
10.2. Nepřímý průkaz TB metodami IGRA	73
10.3. Genotypizace <i>M. tuberculosis</i>	74
11. Závěr	77

1. Úvod

Bakterie druhů komplexu *Mycobacterium tuberculosis* jsou bakterie způsobující onemocnění tuberkulózu. Nejčastěji izolovaným druhem tohoto komplexu u nemocných tuberkulózu je *M. tuberculosis*. Tuberkulóza má velmi dlouhou dramatickou historii a i v současnosti je závažným epidemiologickým problémem. Tuberkulóza je ve světě příčinou úmrtí dvou až tří miliónů lidí za rok, třetina lidské populace si nese tuto bakterii ve svém organismu (WHO 2018). *M. tuberculosis* je zvláštní svými vlastnostmi, patogenitou i epidemiologickou charakteristikou.

Právě z důvodu masivního rozšíření tohoto onemocnění hledá WHO ve spolupráci s jednotlivými státy možnosti a cesty, jak výskyt tohoto onemocnění regulovat, zajistit adekvátní účinnou léčbu i v méně ekonomicky rozvinutých zemích a jak snížit i riziko jeho šíření.

Základní podmínkou omezení výskytu tuberkulózy je diagnostika nemocných. Z laboratorního hlediska je zásadní metodou přímý průkaz tuberkulózního agens ve vzorku klinického materiálu mikroskopicky a kultivačně. Přímý průkaz vhodně doplňuje molekulárně genetické vyšetření, v rutinní praxi nejčastěji na principu PCR. Přímý průkaz je jednoznačným důkazem správné diagnózy, izolace kmene kultivací umožňuje jeho další zkoumání z hlediska přesné identifikace, stanovení citlivosti a stanovení epidemiologických charakteristik. V některých případech přímá diagnostika z různých důvodů není možná. Proto lze využít i metody nepřímého průkazu, ovšem pouze s omezeným dosahem. Protilátková odpověď u tuberkulózy není z diagnostického hlediska zásadní, využívá se detekce imunity buněčné, a to detekce specifické reaktivity B-lymfocytů. Starší z této skupiny metod je tzv. tuberkulinový kožní test (TST) využívající purifikovaný proteinový derivát. Tato metoda je levná, ale méně spolehlivá než moderní metody tzv. IGRA (interferon gama release assay). IGRA metody využívají zjištění produkce interferonu gama lymfocyty senzibilizovanými specifickými tuberkulózními antigeny, a to buď metodou ELISA, nebo spotovou analýzou. Nepřímý průkaz je jediným způsobem, jak prokázat latentní formu onemocnění.

Kromě správné a rychlé diagnostiky tuberkulózy a její léčby má v otázce jejího výskytu a šíření také zásadní význam epidemiologická surveillance. Aktivní vyhledávání nemocných, jejich dispenzarizace a dohledávání kontaktů s potvrzenými onemocněními zajišťuje kontrolu nad výskytem tuberkulózy. Bohužel toto je možné především ve vyspělých státech, kde je úroveň zdravotnictví i epidemiologie a hygieny na vysoké úrovni. Epidemiologická intervence a poznání mechanismů šíření tuberkulózy prodělává v posledních letech obrovský vývoj především díky rozvoji a zdokonalování molekulárně biologických technik. Této problematice se věnuje tato dizertační práce.

Výzkum prezentovaný v této dizertační práci se týkal jednak zmapování jednotlivých metod molekulárně-epidemiologické typizace kmenů *M. tuberculosis* a dále jejich možnosti aplikace do rutinní praxe. Další fází výzkumu byla analýza kmenů izolovaných na území České republiky z hlediska molekulární epidemiologie, jejich zařazení do genetických linií a jejich charakterizace z hlediska přítomnosti mutací genů odpovědných za rezistenci k antituberkulotikům.

Výsledky předkládané v dizertační práci jsou shrnuty v pěti publikacích v impaktovaných časopisech.

Cíle dizertační práce

1. Provést rešerši literatury týkající se molekulárně-genetické diagnostiky v detekci *M. tuberculosis* a související problematiky.
2. Popsat možnosti moderní metody identifikace mykobakterií pomocí hmotnostní spektrometrie.
3. Zanalyzovat dvě dostupné metody IGRA v návaznosti na průkaz latentní tuberkulózy a na možnosti využití v diagnostice tuberkulózy.
4. Vypracovat přehled známých genotypů *M. tuberculosis* včetně jejich geografického rozšíření, popsat princip stanovení těchto genotypů a jejich detekce.
5. Stanovit nejvhodnější dostupnou metodu pro genotypizaci izolátů *M. tuberculosis*, která by byla vhodná pro zavedení do praxe.
6. Na základě této metody zpracovat analýzu souboru vybraných izolátů *M. tuberculosis* izolovaných na území ČR.

2. Rod *Mycobacterium*

2.1. Historie

Mykobakteria provázejí lidstvo od jeho vzniku. Podle Gutierrezovy hypotézy (Gutierrez et al. 2005) se kmeny tzv. *M. prototuberculosis* vyskytovaly v Africe již v době před třemi miliony let. Před 40 000 lety se pravděpodobně prapředek *Mycobacterium tuberculosis* začal z východní Afriky šířit, stejně jako se z tohoto místa přibližně ve stejné době začala šířit i lidská populace (Wirth et al. 2008). Bylo doloženo, že se tuberkulóza (TB) vyskytovala na území celého světa, tedy i na území Ameriky. Salo et al. (1994) vyvrátil teorie o zavlečení tuberkulózy na toto území až s námořnickými plavbami do Nového světa. Na území České republiky je doložen nález DNA *M. tuberculosis* z kosterních pozůstatků dívky z Hnanic u Znojma z doby 4700–3900 let př. n. l. (Vargová et al. 2003). V antickém období Hippokrates označil tuberkulózu za nejrozšířenější onemocnění s horečkou, vykašláváním krve a s vysokou smrtelností. Zvolil pro ni název *phthisis* (ftíza), v překladu z řeckého *ftino* – ubývat, mizet (Hippokrates 400 př.n.l.). Ve středověku byl výskyt tuberkulózy na evropském území relativně malý. V 17. a 18. století se však situace vlivem industrializace, přesunu obyvatel z venkova do měst a rozvojem obchodování po moři zásadně změnila. Tuberkulóza se stala obávaným onemocněním. Kolem roku 1800 to bylo nejčastěji se vyskytující onemocnění, téměř čtvrtina obyvatel na tuberkulózu umírala. Johann Lukas Schönlein v roce 1834 poprvé toto onemocnění pojmenoval jako „tuberkulóza“ na základě projevů na orgánech – drobných uzlíčků „tuberkulů“ popsaných Mortonem již v roce 1689 (Frith 2014a). 24. března 1882 zveřejnil Robert Koch objev a popis bacilu tuberkulózy (Tubercle bacillus), za což v roce 1905 obdržel Nobelovu cenu. Tato bakterie byla nazývána jako Kochův bacil. V roce 1883 byla oficiálně přejmenována Friedrichem Wilhelmem Zopfem na *Bacterium tuberculosis*, v roce 1884 Edwardem Emmanuelem Kleinem na *Bacillus tuberculosis* a v roce 1896 K. B. Lehmanem a R. Neumannem na *Mycobacterium tuberculosis*, poté co byla zařazena do nového rodu *Mycobacterium* (Frith 2014b).

2.2. Druhy rodu *Mycobacterium*

Rod *Mycobacterium* zahrnuje dvě skupiny druhů. Jednak druhy obligátně patogenní, což je komplex druhů *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium leprae*. A dále druhy tzv. netuberkulózní (non tuberculosis mycobacteria NTM) neboli MOTT (mycobacteria others than tuberculosis) někdy také nazývaná potenciálně patogenní mykobakteria (PPM). Těchto netuberkulózních druhů je velmi mnoho, odlišují se geneticky, fenotypově i stupněm patogenity. Jako skupina jsou charakterizovány vysokým stupněm rezistence k antituberkulotikům (AT) a antibiotikům (ATB). Z hlediska patogenity nepředstavují epidemiologicky závažný problém, protože se interhumánně nepřenášejí. Zástupci komplexu *M. tuberculosis* se ovšem mezi lidmi přenášejí nejčastěji jako kapénková infekce, epidemiologické riziko je velmi vysoké a tuberkulóza je stále ve světě jedním z hlavních infekčních rizik.

3. *Mycobacterium tuberculosis*

3.1. Taxonomické zařazení druhu

Mycobacterium tuberculosis je bakterie s velmi starou a bohatou historií. Taxonomické zařazení je uvedeno v tabulce 1 (BioLib 2016).

Tabulka 1 – Taxonomické zařazení *M. tuberculosis*

soustava	Vitae – živé organismy
doména	Bacteria (Haeckel 1894) Woese, Kandler Wheelis 1990 – bakterie
kmen	Actinobacteria Margulisová 1974 – aktinomycety
třída	Actinobacteria Stackebrandt, Rainey & Ward-Rainey 1997
podtřída	Actinobacteridae Stackebrandt et al. 1997
řád	Actinomycetales Buchanan 1917
podřád	Corynebacterineae Stackebrandt et al. 1997
čeleď	Mycobacteriaceae Chester 1897
rod	<i>Mycobacterium</i> Lehmann & Neumann 1896
skupina druhů (komplex)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
druh	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Zopf 1883

3.2. Komplex *Mycobacterium tuberculosis*

Do komplexu *M. tuberculosis* jsou zařazeny druhy na základě vysoké genetické podobnosti. Patří sem:

- *M. tuberculosis* (Koch 1882, Zopf 1883, Lehmann and Neumann 1896)
- *M. bovis* (Karlson & Lessel 1970) včetně vakcinačního kmene *M. bovis* BCG (Guérin a Rosenthal 1957)
- *M. africanum* I a II (Castets et al. 1969)
- *Mycobacterium canettii* (Van Soolingen et al. 1997)
- *Mycobacterium caprae* (Aranaz et al. 2003)
- *Mycobacterium microti* (Wells a Oxon 1937, Reed 1957)
- *Mycobacterium pinnipedii* (Cousins et al. 2003)

Někdy do komplexu *M. tuberculosis* bývají zařazeny i další druhy. Zde ale spíše jde o ekotypy adaptované na určitý hostitelský druh, např. *M. mungi*, *M. orygis* nebo *M. surricatae* (viz dále) (Van Ingen et al. 2012).

Druhy *M. tuberculosis*, *M. africanum* a *M. canettii* jsou považovány za lidské, druhy *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* a *M. surricatae* za zvířecí. Druh *M. bovis* má širší škálu hostitelů včetně člověka.

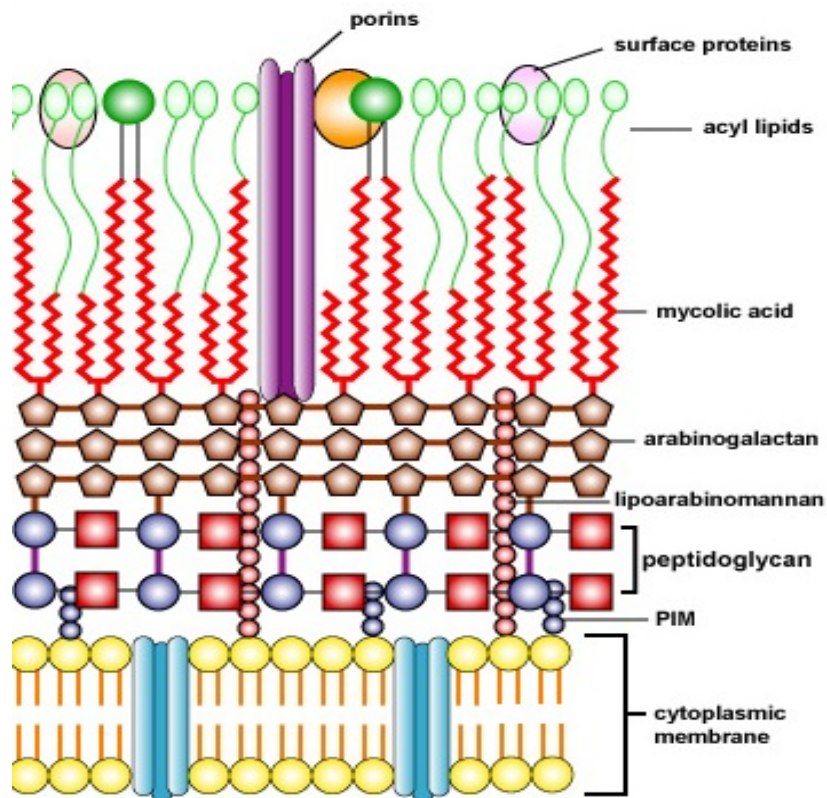
Rozlišení jednotlivých druhů v rámci *M. tuberculosis* komplexu může být v rutinní diagnostice obtížné. Základní diagnostika se opírá o fenotypické charakteristiky jako je morfologie kolonií, produkce volného niacinu (kyseliny nikotinové) produkovaného *M. tuberculosis* a detekovaného ve vodných extraktech z kultury na vaječných půdách jako deriváty kyanidu (Mahon et al., 2014), redukce nitrátů, rezistence k TCH – hydrazid 2thiofen-karboxylové kyseliny a pyrazinamidu (Collins 1997).

Druhy komplexu *M. tuberculosis* patří jako všechna mykobakteria mezi acidorezistentní tyčinky.

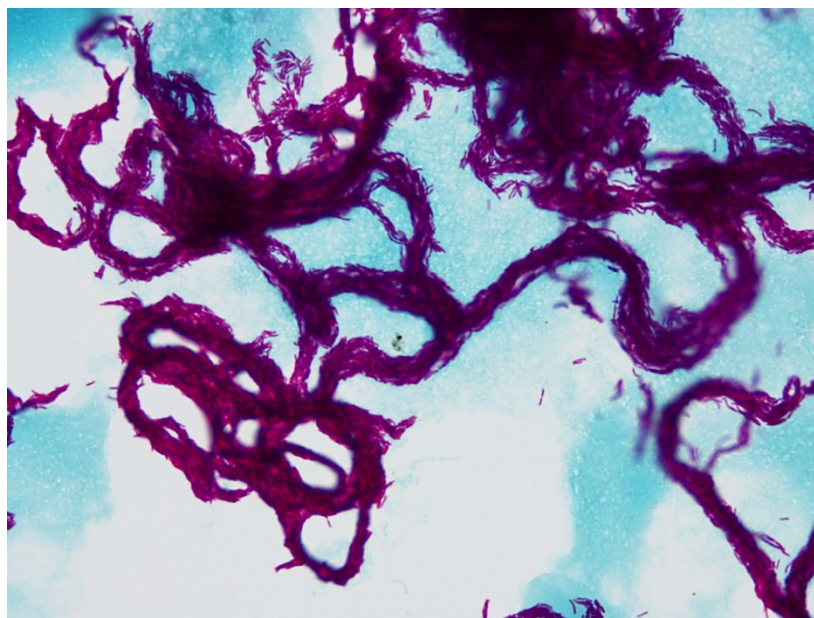
3.3. Vlastnosti komplexu *M. tuberculosis*

Mykobakteria jsou štíhlé tyčinky, velmi odolné vůči vlivům zevního prostředí jako např. změnám pH, vyschnutí, nízké teplotě díky specifickému složení buněčné stěny. Pro svoji rezistenci vůči kyselému a zásaditému prostředí se označují jako acidorezistentní tyčinky (ART).

Jejich buněčná stěna obsahuje mykolové kyseliny, komplex vosků a glykolipidů (Baron 1996). Mykolové kyseliny obsahují extrémně dlouhé postranní řetězce s 60–90 uhlíky a jsou připojeny k části muramové kyseliny peptidoglykanu fosfodiesterovým můstkem a k arabinogalaktanu esterifikovanou glykolipidovou vazbou (viz obrázek 1). Variabilita druhů je charakterizována variantou cukru v glykolipidech a peptidoglykolipidech. Ve stěně je obsažen také dimykolát trehalózy, který je označován jako tzv. cord factor. Působí jako faktor patogenity a v tekutých kultivačních půdách determinuje růst *M. tuberculosis* v tzv. provazcích (viz obrázek 2). Na virulenci druhu mají pravděpodobně vliv i mykobakteriální sulfolipidy a lipoarabinomannan (LAM), jehož strukturální variabilita má vliv na produkci cytokinů aktivovanými mononukleáry (Baron 1996).



Obrázek 1 – Struktura buněčné stěny acidorezistentních bakterií (Kaiser 2018)



Obrázek 2 – *M. tuberculosis* – tvorba provazců (zdroj vlastní) – barvení dle Ziehl-Neelsena při zvětšení 1000x.

Generační doba mykobakterií je obecně velice dlouhá, u *M. tuberculosis* komplex se pohybuje od 18 do 24 hodin. Klinické izoláty narostou na obohacených kultivačních půdách za 3–6 týdnů (Baron 1996).

V rámci komplexu se jednotlivé druhy dají odlišit na základě hostitelského druhu, růstových vlastností, charakteristik biochemické aktivity a hlavně podle genetických rozdílů (Rodríguez-Campos et al. 2014).

3.4. Evoluce *Mycobacterium tuberculosis* komplex

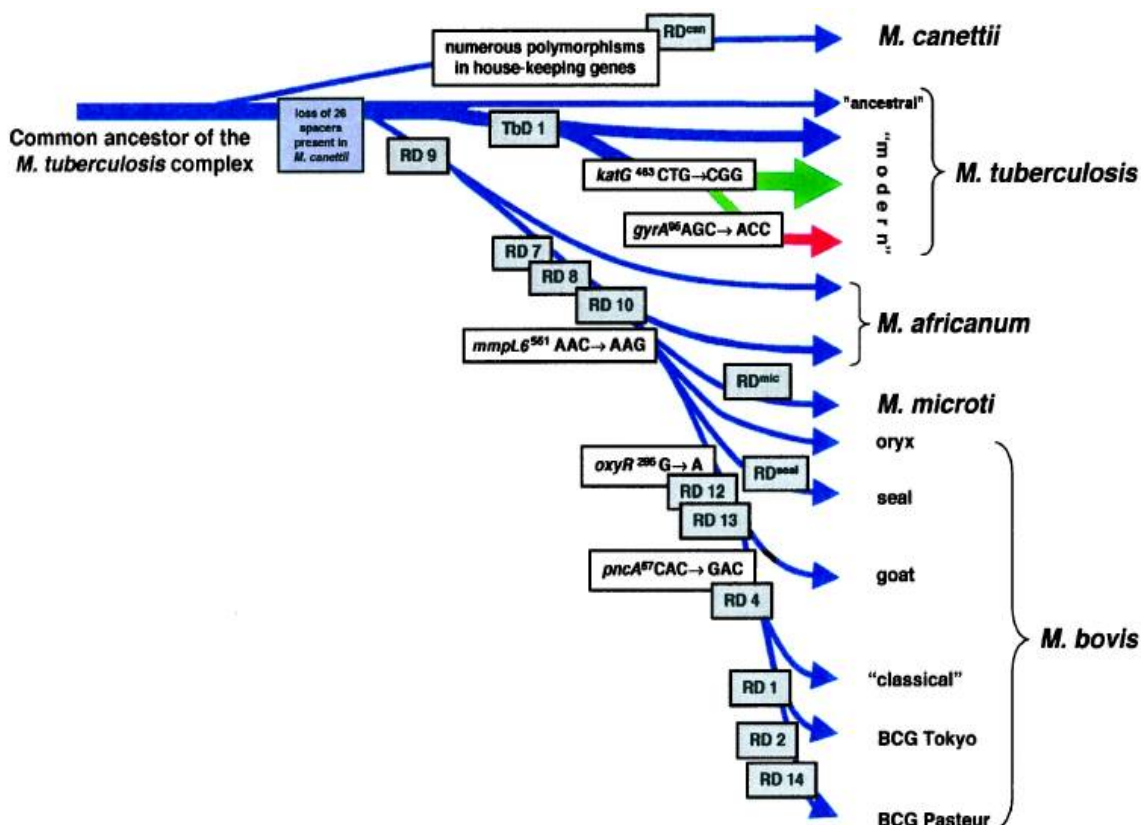
Rozdíly v genomu současných druhů v rámci komplexu *M. tuberculosis* vycházejí z evolučního vývoje jejich předchůdců. U druhů komplexu *M. tuberculosis* nebyl prokázán horizontální přenos genů, jejich genom je v porovnání s jinými patogenními bakteriemi konzervativní (Sreevatsan et al. 1997a). Během evoluce docházelo ke třem typům genomových změn. Jednak to jsou změny v jednotlivých nukleotidech (single nucleotide polymorphism – SNP), dále změny v dlouhých sekvencích (large sequence polymorphism – LSP), obě tyto skupiny představují ireverzibilní změny a mohou být využity pro výzkum vývojových změn. Třetím typem změn je polymorfismus repetitivních sekvencí jako jsou variabilní tandemové repetice (VNTR) (Brown et al. 2010, Desikan et Narayan 2015).

Během vývoje prodělaly druhy *M. tuberculosis* komplexu evoluci ve smyslu jednosměrné ztráty chromozomálních sekvencí. Určitý nerepetitivní úsek (tzv. RD9 region of difference RD) byl vymazán a již dále nenahrazen, a tak se tato delece mohla stát biomarkerem klonů pocházejících z této linie mykobakteriálních buněk (Donoghue 2011). Původní teorie o vývoji humánních mykobakteriálních druhů, která předpokládala adaptaci druhu na člověka z druhů zvířecích během neolitické tranzice, je proto již dnes překonaná. Genetické analýzy prokázaly, že ačkoliv jsou mykobakteria adaptovaná na zvířata součástí stejné hlavní vývojové linie (definované evoluční ztrátou úseku DNA – delecí RD), je každý z poddruhů spojen s jiným zvířecím hostitelem. Jde o druhy historicky řazené k *M. bovis*, v současné době již vyčleněné do samostatných druhů – *M. bovis sensu stricto* (dobytek), *M. caprae* (ovce a kozy), *M. microti* (hraboši), *M. pinnipedii* (tuleni a lachtani) a *M. mageritensis* (damani a krysy skalní). Všechny tyto podskupiny patří do linie RD9, jsou definovány na základě charakteristiky LSP (large sequence polymorphisms), kdy region RD9 chybí. Linie RD9 je tedy vývojově mladší a zcela odlišná od linie, která směřuje k vývoji *M. tuberculosis*, kde je region RD9 intaktní – viz obrázek 3 (Brosch et al. 2002, Sreevatsan et al. 1997a).

Linii vedoucí k vývoji samotného *M. tuberculosis*, lze rozdělit na základě přítomnosti nebo chybění specifického regionu TbD1 na větev „starou (ancestral)“, resp. „moderní (modern)“. Moderní větev s chybějícím regionem TbD1 prevaluje ve vyspělých státech a zahrnuje i hlavní epidemiologicky závažné kmeny jako je např. Beijing, Haarlem a africké clustery. *M. tuberculosis* a *M. canetti* jsou tedy od počátku vývoje kmeny humánní (Brosch et al. 2002, Donoghue 2011).

Ze společného prekurzoru *M. tuberculosis* komplex se tedy oddělily dvě vývojové linie – jednak humánní patogeny charakterizované třemi genetickými skupinami (*M. canetti*, linie ancestral a linie moderní) a jednak patogeny bovinní, z nichž je oddělena ještě humánní větev *M. africanum* (Sreevatsan et al. 1997a). Podle výzkumů se předpokládá, že k oddělení linií *M. tuberculosis* a *M. bovis* došlo asi před 20 000 lety (Sreevatsan et al. 1997a), resp. 35 000 let (Hughes et al. 2002).

Mycobacterium africanum je řazeno mezi humánní patogeny, přestože obsahuje delecí RD9 stejně jako patogeny zvířecí. Mohlo by se uvažovat o teorii, že mohlo být primárně adaptováno na zvířata. Žádný zvířecí rezervoár ale dosud identifikován nebyl, a protože *M. africanum* způsobuje 40 % tuberkulózy v západní Africe, je řazeno k patogenům humánním (Mostowy et al. 2004).

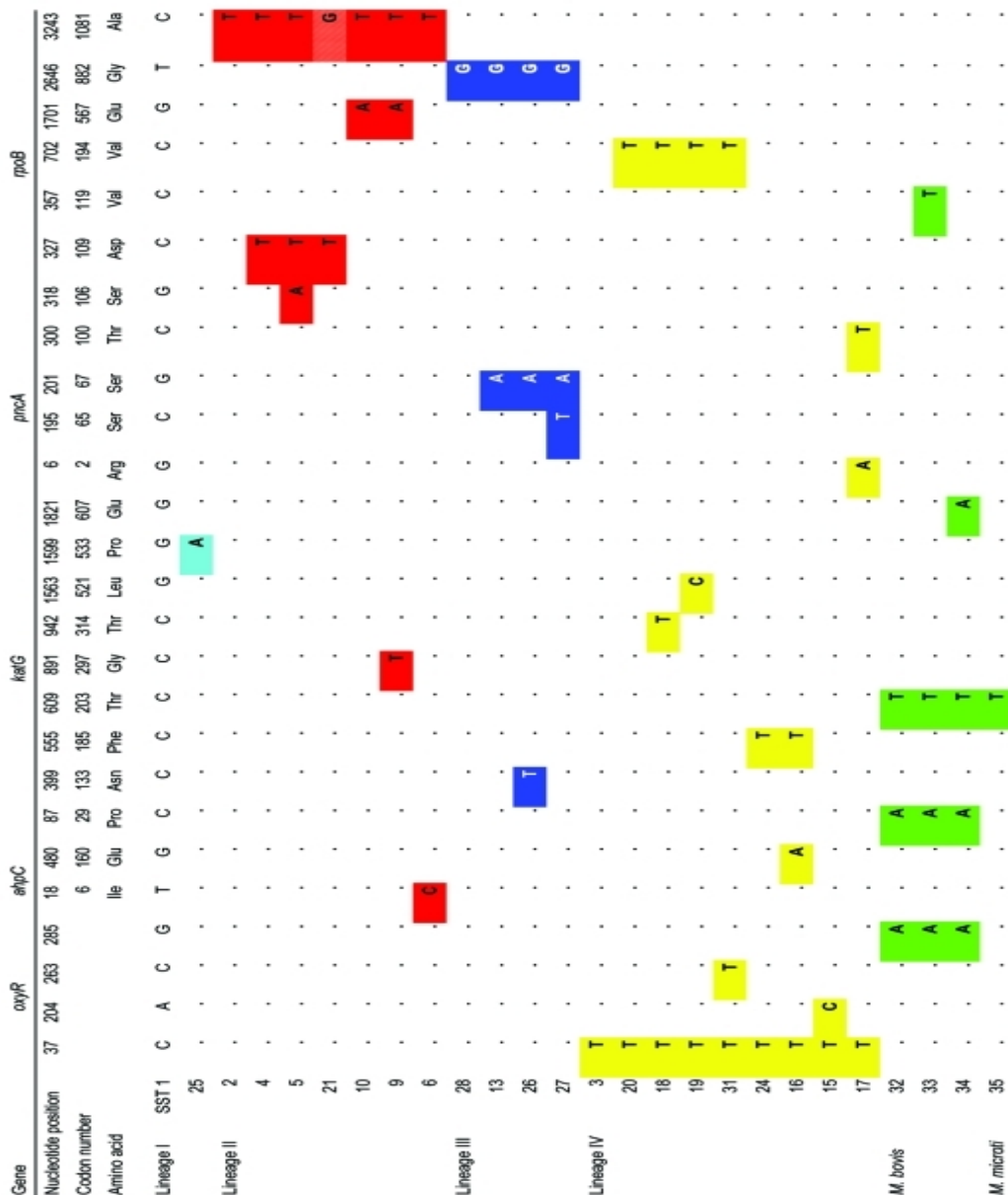


Obrázek 3 – Schéma předpokládaného evolučního vývoje druhů komplexu *M. tuberculosis* (převzato z Brosh et al. 2002).

Během vývoje docházelo k postupné ztrátě DNA v určitých liniích (šedá pole). Schéma je založeno na přítomnosti nebo nepřítomnosti konzervovaných deletovaných oblastí a na sekvenčních polymorfismech v pěti vybraných genech. Modré šipky představují charakterizaci kmenů geny *katG*⁴⁶³ CTG (Leu), *gyrA*⁹⁵ ACC (Thr), typické pro organismy skupiny 1. Zelená šipka znázorňují kmene patřící do skupiny 2 charakterizované *katG*⁴⁶³ CGG (Arg), *gyrA*⁹⁵ ACC (Thr). Červená šipka označuje kmene skupiny 3, charakterizované *katG*⁴⁶³ CGG (Arg), *gyrA*⁹⁵ AGC (Ser), definováno podle Sreevatsan et al. (1997a)

Někteří vědci rozdělili druhy komplexu *M. tuberculosis* i podle jiných kritérií. Na příklad Sreevatsan et al. (1997a) a Soini (2000) použili kritéria založená na SNP (kodon 463 *katG* a kodon 95 *gyrA*, které kódují katalázu a peroxidázu a podjednotku A DNA gyrázy) a druhy rozdělili do tří základních genetických skupin – principal genetic group PGG 1–3, kdy je skupina 1 definována kombinací *katG*^{1388T} (alela CTG leucin) + *gyrA*^{284C} (alela ACC threonin), je vývojově stará a je spojená s *M. bovis*.

Skupina 2 katG^{1388G} (katG CGG arginin) + gyrA^{284C} (gyrA ACC threonin). Skupina 3 vznikla vývojově nejpozději, je spojena spíše se sporadickým výskytem a je definována kombinací katG^{1388G} (katG CGG arginin) + gyrA^{284G} (gyrA AGC serin). Později se přidaly ještě rozdíly SNP v genech oxyR a rpoB a druhy tak byly rozděleny do pěti linií (I–IV, plus *M. bovis*), kdy linie I, III a IV představuje PGG1 a linie II PGG 2 a 3 (Baker et al. 2004), viz obrázek 4. Z toho lze odvodit hypotézu, že vývoj nových patogenů směřuje k redukci virulence a přenosnosti (Sreevatsan et al. 1997a, Soini 2000).



Obrázek 4 – Rozdělení *M. tuberculosis* do hlavních linií podle SNP (převzato z Baker 2004)

Analýzu globální sbírky tuberkulózních kmenů na základě metod LSP a SNP provádělo několik velkých studií s cílem určit základní vývojové linie *M. tuberculosis*. Pět publikovaných studií

(Sreevatsan et al. 1997a, Baker et al. 2004, Gagneux et al. 2006a, Gutacker et al., 2006, Filliol et al. 2006) dospělo ke shodě, že populaci *M. tuberculosis* lze rozdělit do čtyř základních skupin, plus dvě další skupiny pro *M. africanum*. Jde o linie: ancestrální Indo-Oceanic, moderní East-Asian, Euro-American a East-African Indian, dále dvě linie *M. africanum* West African 1 a West African 2. Linie *M. bovis* je řazena zvlášť (Gagneux et Small 2007, Shabbeer et al. 2012). Tyto linie mají přímou souvislost s geografickým výskytem. Úplný evoluční přehled se ale zatím získat nepodařilo.

Diverzita druhů je většinou způsobena rychlou reorganizací genomu pomocí inzerčních sekvencí. Fakt, že genom *M. bovis* obsahuje několik velkých genových delecí a zároveň neobsahuje žádné unikátní geny v porovnání s *M. tuberculosis*, vede některé autory k teorii, že spíše domácí zvířata získala tuberkulózu od lidí (Mostowy et Behr 2005).

Přesnou chronologii rozšíření tuberkulózy není jednoduché určit. Podle mnoha ukazatelů se předpokládá, že původním místem výskytu TB byla Afrika, odtud se pak kmeny šířily během paleomigrace buď přímo mezi lidmi nebo dosud neznámým vektorem (Mostowy et Behr 2005). U člověka byla nalezena DNA komplexu *M. tuberculosis* u 5000 let starých vzorků z Egypta i z Ekvádoru z doby před Kryštofem Kolumbem. Pozůstatky tuberkulózních mykobakterií byly nalezeny u domestikovaných zvířat z doby před 10 000–12 000 lety (Mostowy et Behr 2005).

3.5. Genetická charakteristika komplexu *Mycobacterium tuberculosis*

Všechny druhy komplexu *M. tuberculosis* vykazují 99,9% shodu v sekvenční podobnosti genomů, sekvence 16SrRNA jsou identické. Zřetelně se ale odlišují fenotypově, cílovým hostitelem a patogenitou (Böddinghaus 1990, Sreevatsan et al. 1997a, Brosch et al. 2002). Genetické změny v jednotlivých druzích *M. tuberculosis* komplexu jsou důsledkem převážně spontánních mutací, nikoli horizontálního přenosu genů (transformace, transdukce nebo konjugace), jak tomu je u řady dalších klinicky významných bakterií (Coros et al. 2008). Genetická odlišnost se týká několika molekulárních markerů – viz tabulka č. 2 (Rodriguez-Campos et al. 2014). I když je historický předek všech zástupců komplexu *M. tuberculosis* shodný, některé druhy se vyvinuly jako striktně humánní, jiné jako patogeny hlodavců a např. *M. bovis* jako patogen se širokým spektrem hostitelů. Definitivní pohled na vývoj těchto druhů přinesla až genetická analýza (viz obrázek 3 a 5).

Tabulka 2 – Přehled vybraných molekulárních charakteristik pro druhy komplexu *M. tuberculosis* (převzato z Rodriguez-Campos 2014)

Organism and variety	oxyR ^{ns85} mutation (G to A) ^a	pncA ⁵⁷ mutation (CAC to GAC)	katG mutation at codon:		mmpL6 ^{ns51} mutation (C to G)	gyrA ⁹⁵ mutation (AGC to ACC)	gyrB mutation at nucleotide:					Rv2042c ^{c38}
			203(CT)	463(CTG to CGG) ACC to A			675 (C to T)	756 (G to A)	1311 (T to G)	1410 (C to T)	1450 (G to T)	
<i>M. tuberculosis</i>	G	CAC	ACC	V	C	V	C	G	T	C	G	T
<i>M. africanum</i>	G	CAC	ND	CTG	C	ACC	C	G	T	C	T	T
<i>Dassie bacillus</i>	G	CAC	ACT	CTG	C	AGC	C	G	T	C	T	T
<i>M. mungi</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C	G	T	C	T	T
<i>M. orygis</i>	G	CAC	ACT	CTG	G	AGC	C	G	T	C	T	G
<i>M. pinnipedii</i>	G	CAC	ACT	CTG	G	ACC	C	G	T	C	T	T
<i>M. microti</i>	G	CAC	ACT	CTG	G	ACC	T	G	T	C	T	T
<i>M. caprae</i>	A	CAC	ACT	CTG	G	ACC	C	A	G	C	T	T
<i>M. bovis</i>	A	GAC	ACT	CTG	G	ACC	C	A	T	T	T	T
<i>M. bovis BCG</i>	A	GAC	ACT	CTG	G	ACC	C	A	T	T	T	T

Legenda: V - variable results; ND - no data available. Horní index označuje polohu mutace buď na nukleotidu (n), nebo na kodonu (c) příslušných genů.

3.5.1. Diferenciace druhů komplexu *M. tuberculosis* genetickými metodami

V roce 2003 vytvořil Huard et al. model jednoduché a rychlé typizace druhů komplexu *M. tuberculosis*. V roce 2005 tento model doplnil o nové poznatky genetické struktury těchto druhů. Metoda je založena právě na výskytu chromozomálních region-of-difference lokusů. Tyto lokusy představují ireversibilní změny v genetické struktuře, které jsou pravděpodobně výsledkem chyb v replikaci DNA.

Huard et al. (2003) sledovali v analýze amplifikace lokusů 16SrRNA (jako marker pro určení přítomnosti mykobakteriální DNA), dále Rv0577 (marker pro příslušnost ke komplexu *M. tuberculosis*), IS1561 (absence odlišila *M. microti* v rámci *M. tuberculosis* komplexu), Rv1510

(absence odlišila *M. bovis* a *M. bovis* BCG od *M. tuberculosis* komplexu), Rv1970 (přítomnost vedla k odlišení *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtypu II a *M. canetti*), Rv3877/8 (diferenciace *M. bovis* BCG) a Rv3120 (diferenciace *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae* a *M. canetti*) pomocí sedmi párů primerů. Tuto metodu lze použít k rutinní laboratorní diagnostice a k epidemiologickým účelům (Huard et al. 2003, Huard et al. 2006).

V druzích komplexu *M. tuberculosis* je mnoho polymorfních genetických lokusů, které mohou být použity pro vývojové studie. Patří sem např. tzv. Direct Repeat lokusy (DR), ve kterých se střídají identické a variabilní mezerníky (spacers) (Brudey et al, 2006). Tyto DR lokusy patří mezi tzv. **CRISPR** segmenty (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) sloužící jako jakýsi imunitní systém prokaryot (Barrangou 2007 Zhang 2010). Podle genetického mapování výskytu určitých genotypů *M. tuberculosis* komplex je možné tvořit hypotézy o jejich vývoji, šíření a přenosu, což může být zásadní pro epidemiologii tuberkulózy, pro molekulární ekologii i pro systematickou poddruhovou taxonomii druhů komplexu *M. tuberculosis* (Brudey et al. 2006). V současné době je k dispozici čtvrtá verze databáze genotypů *M. tuberculosis* komplex podle DR lokusů, která reprezentuje izoláty pocházející od nemocných TB ze 141 zemí – SpolDB4, popisující 1939 klastřů izolátů = společných genetických typů shared-types (ST) na téměř 40 000 kmenů (Brudey et al. 2006). Podle této verze je definováno 62 genetických linií (sublinií). Pro vlastní *M. tuberculosis* bylo definováno 22 linií sdružených do devíti hlavních skupin – CAS (Central-Asian), EAI (East-African-Indian), Beijing, H (Haarlem), LAM (Latin-American-Mediterranean), MANU (nová skupina s výskytem v Indii), S (Sicilie a Sardinie), X (chybějící charakteristické spacers, vysoká prevalence v anglicky mluvících zemích), T („současné“ kmeny se značnou variabilitou). Další druhy komplexu *M. tuberculosis* jsou zastoupeny skupinou BOV (*M. bovis*), AFRI (*M. africanum*), microti (*M. microti*), canetti (*M. canetti*), PINI (*M. pinipedii* a *M. caprae*) (Brudey et al. 2006, Sebban et al. 2002).

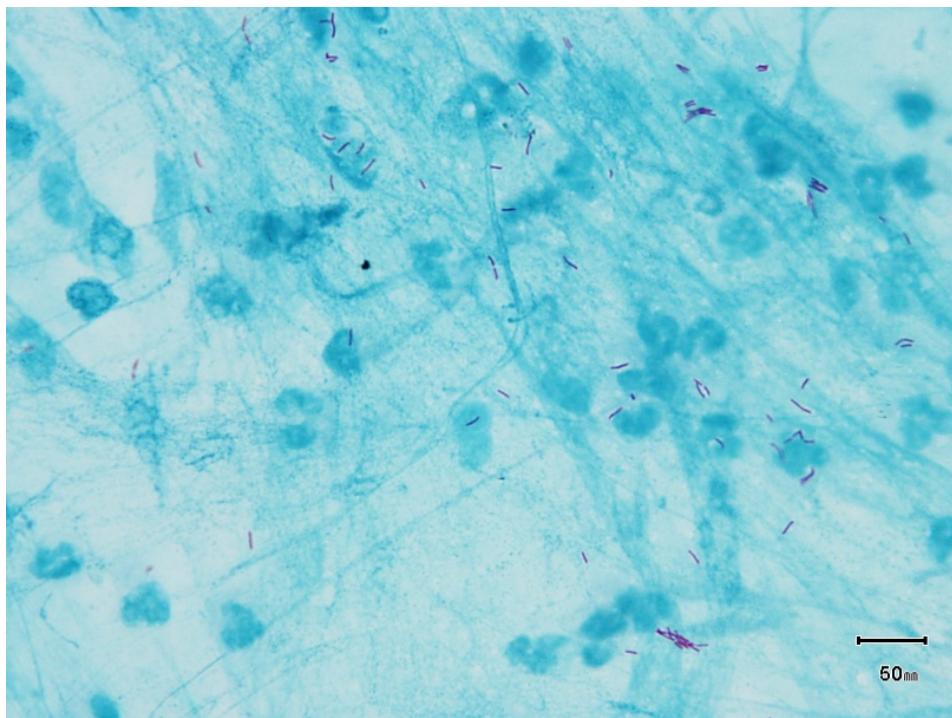
3.6. Charakteristika jednotlivých druhů komplexu *M. tuberculosis*

3.6.1. *Mycobacterium tuberculosis* sensu stricto

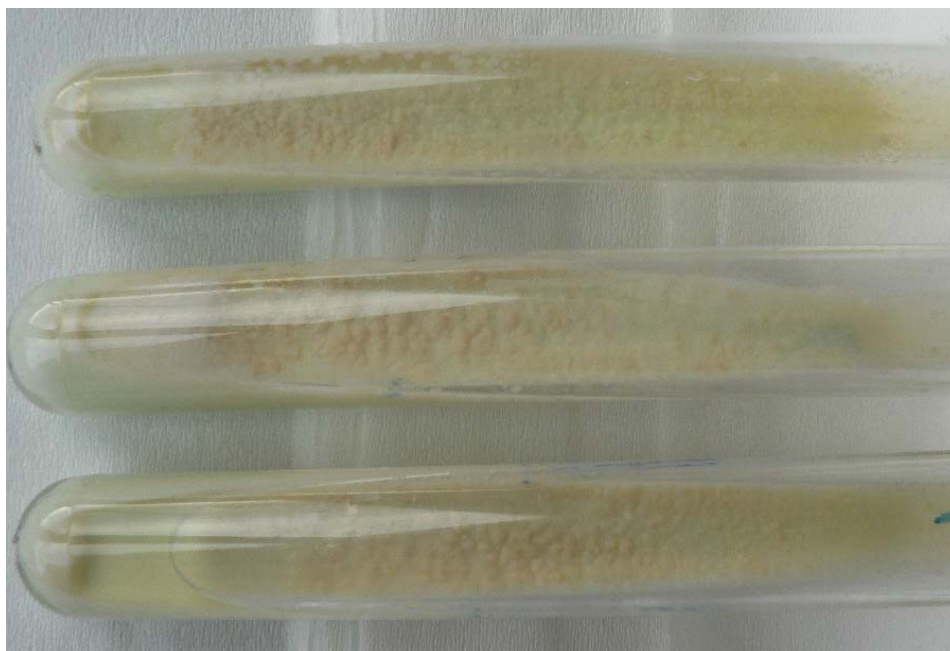
M. tuberculosis patří mezi obligátně patogenní bakterie, způsobuje onemocnění tuberkulózu. Je považováno za lidského patogena, i když je v literatuře popsán i přenos na zvíře, např. psa (Trčka et al. 2005). Ze všech druhů komplexu *M. tuberculosis* se *M. tuberculosis* sensu stricto uplatňuje v etiologii tuberkulózy nejčastěji, téměř výlučně (s výjimkou Afriky). *M. tuberculosis* je striktně aerobní nepohyblivá, nesporeující acidorezistentní tyčinka rovného nebo mírně zahnutého tvaru, velikosti 0,2–0,5 μm na 2–4 μm (viz obrázek 5). Generační doba je extrémně dlouhá 24 – 48 hodin. Na vaječných půdách roste v suchých drsných R koloniích (viz obrázek 6).

M. tuberculosis není příliš metabolicky aktivní, v diagnostice se využívá nejčastěji jeho produkce niacinu, redukce nitrátů a rezistence k TCH. Tato bakterie secerenuje protein MPT64 (molekulová hmotnost 24 kDa), který pravděpodobně v první fázi infekce reaguje s imunitním systémem člověka

(Mustafa 2010). Jeho detekce se využívá také v laboratorní diagnostice k rozlišení příslušnosti k *M. tuberculosis* komplexu a NTM. Existují však i kmeny MPT64 negativní (Nerurkar et al. 2016).



Obrázek 5 – *Mycobacterium tuberculosis* v barvení podle Ziehl-Neelsena ve zvětšení 1000× (zdroj vlastní).



Obrázek 6 – *Mycobacterium tuberculosis* na kultivační půdě Löwenstein-Jensen, růst za 42 dní (zdroj vlastní).

Standardní kmeny *Mycobacterium tuberculosis*

Kmen Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Kmen H37 byl izolován doktorem Baldwinem v roce 1905 ze sputa od 19letého pacienta, muže s plicní formou tuberkulózy (vzorek číslo H37). Od té doby se používá k experimentálním účelům, protože má zachovanou standardní virulenci (studováno na zvířecím modelu, morčatech). Zatímco jiné virulentní kmeny ztrácejí laboratorním pasážováním svoji virulenci, tento kmen si plnou virulenci uchovává od doby své izolace v roce 1905 (Cole 2002).

V roce 1934 byl rozdělen podle virulence Steenkenem na H37Rv (virulentní) a H37Ra (avirulentní), byly popsány fyzické a biochemické charakteristiky těchto variant (Steenken et al. 1934). Tyto kmeny jsou dosud udržovány v Trudeau Institute (Steenken et al., 1934). Původní kmen byl bohužel ztracen (Ioerger 2010). V původním označení bylo použito písmeno R jako symbol pro variantu kmene rezistentní (a také S pro kmen citlivý) vůči vlivům prostředí.

Kompletní genom kmene H37Rv byl osekvenován v roce 1998 (Cole 1998) a znovu interpretován v roce 2002 (Camus 2002). Jeho velikost je 4,4 miliónu bází a obsahuje zhruba 4000 predilekčních genů kódujících proteiny, z nichž u 40 % neznáme jejich funkci (Sasseti et al. 2003). Obsahuje zhruba 65,6 mol% bází G+C (Cole 2002).

Kompletní sekvenace genomu kmene H37Ra byla provedena v roce 2008, kdy byl zároveň porovnán genom obou kmenů H37Ra ATCC25177 a H37Rv (Zheng et al. 2008). Oba kmeny jsou si vysoce podobné co do obsahu genů a jejich uspořádání. Genom H37Ra je větší o 8 445 bp (o 53 insercí a 21 delecí). Rozdíly v repetitivních sekvencích jako jsou IS6110 a geny rodiny PE/PPE/PE-PGRS jsou podkladem pro hrubé genetické změny (Cole et al. 1998, Ioerger, 2010). Zheng et al. (2008) ve své studii zaznamenal 272 polymorfismů v porovnání obou kmenů. Tyto objevy jsou využívány nejen k poznání patogeneze *M. tuberculosis*, ale mají také svůj význam při vývoji vakcín a antituberkulotik (Zheng et al. 2008).

Struktura IS6110 není pro kmen H37Rv homogenní, proto je nutné k epidemiologickým účelům znát všechny varianty. Fingerprinting analýza IS6110 DNA odlišila 10 různých H37 variant (Bifani 2000).

Kmen M. tuberculosis Erdman

Tento kmen byl izolován z lidského sputa na Klinice Mayo (Rochester, MN) v roce 1945 Williamem H. Feldmanem. Uložen je ve sbírce kultur mykobakterií Trudeau od roku 1946 (Trudeau Mycobacterium Culture Collection). V roce 1970 by zmražen při -70 °C. Stejně jako předchozí kmen je využíván k výzkumným účelům pro svoji stabilní virulenci, zejména pro studium imunizace a virulence. *In vivo* (u myši) vykazuje rychlejší generační dobu než dva atenuované kmeny *M. tuberculosis* H37Ra and *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG). Oproti kmenu H37Rv je pak generační doba jen mírně rychlejší (Miyoshi et al. 2012). Označení kmene je *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 35801 / TMC 107 / Erdman).

Purifikovaný proteinový derivát

Purifikovaný proteinový derivát (PPD) je široce používaná směs antigenů pro diagnostiku tuberkulózy. Její složení není ovšem striktně definováno, protože mykobakteriální proteiny jsou rozsáhle denaturovány během celého procesu jeho přípravy (Borsuk et al. 2009).

První pokusy s proteinovým derivátem – glycerinovým extraktem tuberkulózních bacilů prováděl Robert Koch již v roce 1890. Pokoušel se využít jej k léčebným účelům, což se ukázalo jako nevhodné. Tento extrakt je označován jako „Old Tuberculin“ (OT) (Yang et al. 2012). V roce 1907 použil jako první derivát k podkožní aplikaci Clemens Von Pirquet a v roce 1908 tuto metodu definoval jako kožní test pro detekci tuberkulózy Felix Mendel. Jako PPD byl pojmenován stabilnější derivát Florence B. Seiberta z roku 1934 (Yang et al. 2012).

PPD se využívá k diagnostice recentní infekce tuberkulózou a k detekci reakce na přítomnost tuberkulózních antigenů v organismu. Provádí se tzv. tuberkulinový kožní test (TST), označovaný jako Mantoux test po francouzském lékaři Charlesovi Mantouxovi (1877–1947), který jej do diagnostiky zavedl a stanovil diagnostická kritéria (Yang et al. 2012). Reakce na tuberkulin neboli PPD se projevuje jako imunopatologická (alergická) reakce IV. (pozdního – tuberkulinového) typu.

PPD se vyrábí tepelnou sterilizací kmene *M. tuberculosis* vykultivovaného v bujónu ve stáří 6 týdnů. Po sterilizaci teplem následuje sterilizace filtrací a koncentrace proteinů využívající ultrafiltraci nebo precipitaci se síranem amonným. Přesné účinky aktivních komponent proteinů nejsou známy. Některé z antigenů jsou shodné pro *M. tuberculosis* i pro vakcinační kmen *M. bovis* BCG, tudíž kožní test využívající tento PPD nerozliší mezi infekcí *M. tuberculosis* a stavem po vakcinaci. Podobně lze PPD vyrobit i z kmene *M. bovis* nebo *M. avium* (Dall’Stella et al. 2007, Borsuk et al. 2009). Aviární PPD se využívá především ve veterinární medicíně (Vyhláška č. 299/2003 Sb.).

3.6.2. *Mycobacterium bovis*

Druh, který se svými vlastnostmi odlišoval od *M. tuberculosis* a byl izolován od hovězího dobytka, byl poprvé zaznamenán v roce 1896 harvardským patologem a epidemiologem Theobaldem Smithem. Všiml si, že onemocnění tuberkulózou prokazované pokusem na zvířeti (králíkovi) má jinou intenzitu, pokud se jedná o kmen přenesený z lidských nebo bovinních tuberkulů. Kmeny izolované od dobytka měly mnohem větší infekciozitu pro králíka než kmeny od lidí. Dokázal, že původní Kochův předpoklad o stejném původu tuberkulózy lidské a bovinní je mylný (Smith 1896). Tento postup byl využit jako první možnost odlišení tuberkulózy lidské (*M. tuberculosis*) a bovinní (*M. bovis*) (Gagneux 2009). Formálně byl ale tento druh popsán a uveden až v roce 1970 Alfredem G. Karlsonem a Erwinem F. Lesselem (Karlson et Lessel 1970).

Tento druh je primárně patogenní pro zvířata, hlavně pro čeled' turovitých, epidemiologickým problémem může být u chovů skotu. Může ale napadat i jiná zvířata, např. prasata, psi, kočky i rozmanité divoké druhy zvířat. Vyskytuje se celosvětově (Parish et Brown 2009).

První celogenomová sekvence byla provedena v roce 2003. Bylo zjištěno, že *M. bovis* má mnohem menší genom než *M. tuberculosis*. To by potvrdzovalo teorii, že se druh *M. bovis* vyvinul z předka podobného *M. tuberculosis* (Garnier et al. 2003).

***Mycobacterium bovis* BCG**

Generální ředitel Pasteurova institutu v Lille Albert Calmette se svým spolupracovníkem Camillem Guérinem začali v roce kontinuálně subkultivovat vysoce virulentní kmen *M. bovis* izolovaný z kravského mléka. Tento kmen obdrželi od kolegy veterináře Edmonda Nocard a nazvali jej „Nocardovo mléko“. Subkultivaci prováděli na kultivačním médiu z vařených brambor a hovězí žluče s glycerinem. Celý proces trval 13 let a nepřerušila jej ani první světová válka. Po 34 pasážích získali kmen, který ani po aplikaci vysoké dávky hovězímu dobytku, morčatům ani opicím nezpůsobil tuberkulózní léze (Calmette et Guérin 1913). Po 230 pasážích kmen svoji virulenci kompletně a stabilně ztratil a stal se dnes známým Bacille de Calmette et Guérin (BCG) (Calmette et Guérin 1924, Nor et al. 2014). Vakcinace tímto kmenem byla vyzkoušena na mnoha druzích zvířat s výborným efektem. Na člověku byla vakcína otestována poprvé v červenci roku 1921 v Paříži z indikace Benjamina Weill-Halla a Raymonda Turpina. Byl naočkován novorozenec s vysoce rizikovou rodinnou anamnézou (matka na TB po porodu zemřela, babička měla rozsáhlou aktivní TB) třemi dávkami vakcíny perorálně (3., 5. a 7. den života). Nebyly zaznamenány žádné škodlivé účinky a dítě tuberkulózou neonemocnělo (Nor et al. 2014, Luca 2013). Bylo zahájeno plošné očkování novorozenců proti TB. Zpočátku byla vakcína aplikována perorálně, posléze pak byla WHO doporučena aplikace intradermální kvůli možnosti přesnějšího dávkování (Nor et al. 2014). V roce 1930 byla spolehlivost očkování proti tuberkulóze poznamenána katastrofální nehodou. Vakcína dodaná z Pasteurova institutu do Lübecku byla připravována v mykobakteriologické laboratoři a při nedbalé manipulaci byla kontaminována virulentním tuberkulózním kmenem. Z 250 naočkovaných dětí 73 zemřelo a u dalších 135 propukla tuberkulóza (Luca 2013). Důvěra ve vakcinaci byla oslabena. V pozdějších letech byla nastavena přísnější pravidla pro výrobu vakcín.

Původní kmen BCG byl ztracen, v Pasteurově institutu v Lille jsou uchovány kmeny z průběžného pasážování *M. bovis*, ale není jasné, jestli jsou stále životaschopné (Nor et al. 2014). Od roku 1921 je Bacille Calmette Guérin (BCG) jedinou licencovanou vakcínou pro tuberkulózu. (Rodriguez-Campos et al. 2014).

V bývalé Československé republice začala vakcinace proti tuberkulóze, tzv. kalmetizace, v letech 1948–1949 při celostátní akci UNICEF. Byly očkovány tuberkulin negativní děti a mladiství ve věku 1–18 let. Plošné očkování novorozenců bylo u nás zahájeno v roce 1953 za přispění pražské BCG laboratoře Státního zdravotního ústavu za vedení Ladislava Šuly. Vznikl tzv. pražský podkmen BCG 725 používaný téměř 30 let, v roce 1980 byl z politických důvodů nahrazen méně kvalitní sovětskou BCG vakcínou odvozenou z původního francouzského BCG kmene (Svobodová 2014).

Ačkoliv vakcinační BCG kmeny užívané ve světě pocházejí z jednoho kmene, liší se svojí zbytkovou virulencí, alergizační a imunizační schopností a viabilitou (Milstien et Gibson 1990). Vyšší zbytkovou virulenci a také vyšší procento komplikací mají kmeny: dánský 725 a 1331 (Copenhagen), francouzský (Pasteur) a sovětský. Slabé kmeny jsou: japonský (Tokyo), anglický (Glaxo) a také pražský podkmen 725 (Milstien et Gibson 1990, Křepela et Mladá 2008). V poslední době byla popsána řada genetických a antigenních variant BCG kmenů (Oettinger et al. 1999).

Protektivita vakcíny je velmi vysoká v prevenci závažných a disseminovaných TB infekcí u dětí, u dospělých je ale její ochranný vliv omezený. Lepší účinky má u dospělých proti leprě než proti TB (Nor et al. 2014).

Léčebné využití BCG

Vakcína BCG se s úspěchem využívá při léčbě uroteliálních karcinomů močového měchýře. Mechanismus účinku není přesně znám, ale pravděpodobně dochází stimulací antigenů BCG k rozvoji imunitní reakce, která působí i proti maligním buňkám. Poprvé byla tato terapie použita v roce 1976 (Morales et al. 1976).

3.6.3. *Mycobacterium africanum*

Tento druh se vyskytuje především v Africe, kde způsobuje více než polovinu případů humánní tuberkulózy. Předpokládá se, že je poměrně velkým rezervoárem latentní tuberkulózy, i když jeho potenciální progrese je malá (De Jong et al. 2010a). Popsán byl v roce 1968 (Castets et al. 1968) z kmenů izolovaných v Africe (Senegal), byl charakterizován jako přechod mezi *M. tuberculosis* a *M. bovis* (Rodriguez-Campos et al. 2014).

Je zastoupen dvěma odlišnými druhy původně označenými jako *M. africanum* West African I a *M. africanum* West African II (de Jonge et al. 2010a, David et al. 1978). Přesné zařazení do subspecies komplikuje variabilita biochemických testů. Proto jsou k tomuto účelu využívány zejména genové typizační techniky. Na jejich základě je podle posledních výzkumů *M. africanum* I rozděleno na *M. africanum* typ I, West African 1 (MAF1) s prevalencí výskytu v oblasti Guinejského zálivu a *M. africanum* type I, West African 2 (MAF2) vyskytující se hlavně v západní části Západní Afriky. Východní vývojová větev – *M. africanum* typ II byla překlasifikována *M. tuberculosis* sensu stricto a představuje tzv. genotyp „Uganda“ (Mostowy et al. 2004, de Jonge et al. 2010b).

Z hlediska biochemické aktivity lze tento druh zařadit uprostřed mezi *M. tuberculosis* a *M. bovis*. Jako *M. tuberculosis* je citlivé k pyrazinamidu a rezistentní k TCH (hydrazid thiophen-2-karboxylové kyseliny), jako *M. bovis* je charakterizován pomalejším, spíše dysgonickým růstem, slabou produkcí niacinu, negativitou nebo jen slabou schopností redukce nitrátů a lepším růstem v mikroaerofilním prostředí na půdách s pyruvátem. Tento druh ovšem zahrnuje velkou škálu biochemických fenotypů.

Z genetického hlediska představuje *M. africanum* 3 skupiny. První skupina je charakteristická chyběním regionu TbD1, ale přítomností regionů RD7, RD8, RD9 a RD10. Druhá skupina zahrnuje

kmeny, kde je delece RD9, ale RD7, RD8 a RD 10 jsou přítomny. Ve třetí skupině chybí kmenům všechny uvedené regiony (RD7, RD8, RD9, RD10) (Mostowy et al. 2004).

V České republice bylo doposud izolováno jen jednou v roce 2011 (Svobodová 2013), a to u cizince ze západní Afriky (Nigérie).

3.6.4. *Mycobacterium canetti*

První zmínka o tomto druhu zazněla poprvé v roce 1969 od francouzského mikrobiologa George Canettiho, když popsal „zvláštní kmen *M. tuberculosis*“ s růstem v hladkých koloniích. Detailně byl tento druh popsán v roce 1997 z kmene izolovaného od somálského chlapce s lymfadenitidou a popsán jako nový taxon v rámci komplexu *M. tuberculosis*. Tento kmen se nelišil od *M. tuberculosis* ani biochemicky ani sekvencí 16SrRNA, ale lišil se fenotypově – tvořil hladké lesklé kolonie (Van Soolingen et al. 1997). Tyto růstové odchylky jsou podmíněny změnami v buněčné stěně, které se týkají glykolipidů, lipooligosaccharidů (LOSS) a mykosidů (vosků v mykobakteriální buněčné stěně) (Pérez et al. 2004). Virulence těchto hladkých kmenů bývá vyšší než virulence kmene po několika pasážích při konverzi do drsného růstu, přičemž konverze bývá nevratná. Na základě genetické analýzy tohoto kmene byl druh *M. canetti* vyčleněn z *M. tuberculosis*. Popsané rozdíly se týkaly hlavně přítomností inzerční sekvence IS1081, kdy u tohoto kmene byla detekována jen jedna (u *M. tuberculosis* je popisováno v genomu 4–7 kopií). Metodou spoligotypingu byl odhalen další rozdíl v počtu 43 různých krátkých mezerníků (spacer) v DNA sekvenci na polymorfním DR lokusu (*M. canetti* jen dva) (Van Soolingen et al. 1997). Vývojově představuje *M. canetti* samostatnou linii ze společného předchůdce *M. tuberculosis* komplex (Brosch et al. 2002).

Jde o lidský patogen vyskytující se především v Africe. Rezervoár ale není stále přesně znám (Rodrigues-Campos et al. 2014). Není vyloučeno, že člověk může být i jen nepřímý hostitel (Mostowy et Behr 2005).

3.6.5. *Mycobacterium caprae*

Tento druh byl popsán poprvé v roce 1999 jako *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* z diseminované tuberkulózní infekce u kozy. Hlavní charakteristiky odlišující nový druh od dosud známých druhů byly specifické kombinace polymorfismu genů *pncA*, *katG* and *gyrA* a specifická struktura IS6110 (RFLP), DR lokusy, polymorfní sekvence bohaté na GC nukleotidy a VNTR charakteristiky (Aranaz 2003). V roce 2002 byl na základě genotypových a fenotypových charakteristik druh přejmenován z *M. tuberculosis* subsp. *caprae* na *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* (Niemann 2002), ovšem dalším výzkumem se potvrdilo, že *M. caprae* je vývojově starší než *M. bovis*, a tudíž by mělo zůstat pod skupinou *M. tuberculosis* (Brosch et al. 2002, Mostowy et al. 2004).

M. caprae je primárně zvířecí patogen, vyskytuje se i v Evropě (Francie, Rakousko), vyskytuje se u koz, ale i u jiných druhů zvířat (prasata, jeleni...). Byla popsána i onemocnění u lidí, často v souvislosti s chovem dobytka, hlavně koz (Gutiérrez et al. 1997). V České republice bylo toto mykobakterium izolováno také, a to u dobytka – tři outbreaky v letech 1966, 1991, 1995, dále v roce

1999 u jelena z farmářského chovu (Pavlík et al. 2002a). Byl prokázán i případ onemocnění u člověka v roce 1999 (Pavlík et al. 2002b). Výskyt bovinní tuberkulózy u zvířat obecně je v České republice monitorován, každý outbreak může představovat epidemiologické riziko pro lidi.

3.6.6. *Mycobacterium microti*

Tento druh je fylogeneticky velmi blízky *M. tuberculosis*. Liší se jen v několika málo biochemických vlastnostech a jeho virulence pro člověka je nižší (Frota et al. 2004). Druh byl objeven v roce 1930 u hrabošů a pojmenován v roce 1937 A. Q. Wellsem jako „hraboší bacil“ – voles mycobacterium (Wells 1937). Později byl označen jako *M. tuberculosis* var. *muris*, protože jej dostupnými metodami nebylo možné odlišit od *M. tuberculosis*. Druh pojmenoval v roce 1957 Reed (Reed 1957).

Tento druh se také využíval k výzkumu a vývoji očkovací látky proti *M. tuberculosis*. Této problematice se intenzivně věnoval český ftizeolog a mikrobiolog Ladislav Šula (1912–1992). Jedna z očkovacích látek, kterou vytvořil (tzv. M-vakcína), pocházela z kmene *M. microti* (Svobodová 2014, Frota et al. 2004). Tato vakcína byla s úspěchem používána v letech 1951–1969, kdy bylo intradermálně naočkováno přibližně 500 000 osob, hlavně novorozenců (Frota et al. 2004).

Jde také o zvířecí mykobakterium, které napadá především drobné hlodavce – myšice, norníky a rejsky. Vzácně se může vyskytovat u lam, koček a prasat. Člověk je nakažen jen velice vzácně (Frota et al. 2004).

3.6.7. *Mycobacterium pinnipedii*

Toto mykobakterium bylo poprvé izolováno z uhynulých tuleňů (pinnipeds) s plicní „tuberkulózou“ v mořském parku v Austrálii v roce 1991 (Forshaw et Phelps 1991). Jako nový druh *M. pinnipedii* bylo pojmenováno v roce 2003 (Cousins et al. 2003). Specifita tohoto druhu byla potvrzena dalšími genetickými studiemi (Bigi et al. 2005).

Je to zvířecí patogen, vyskytuje se u mořských savců, za určitých okolností se může přenášet i na suchozemské savce, event. i na člověka (hlavně ošetřovatelé těchto zvířat) (Rodriguez-Campos et al. 2014).

3.6.8. *Mycobacterium suricattae*

Tento druh byl izolován od afrických surikat. Geneticky je velmi podobný *M. mungi* a dassie bacillus, vývojově patří k větvi *M. africanum* subtyp1 (Parsons et al. 2013, Dippenaar et al. 2015).

3.6.9. Další ekotypy

Oryx bacillus byl poprvé popsán jako varianta *M. bovis* vyskytující se u afrických antilop v roce 1976 (Lomme 1976), geneticky popsán a navržen Van Ingenem, aby byl uznán samostatným druhem (*Mycobacterium orygis*) (Van Ingen et al. 2012). Tento druh se objevuje u antilop a některých dalších savců v Africe a jižní Asii, člověk se může nakazit při kontaktu s těmito živočichy.

Další je tzv. *dassie bacillus*, popsáný už v roce 1958 a vyskytující se u afrických damanů (místně nazývaných *dassie*) (Wagner 1958). Vyskytuje se převážně v Africe a střední Asii.

Další je podobný patogen u mangust, který je navržen na pojmenování *Mycobacterium mungi* (Alexander et al. 2010). Tento druh spolu s *dassie bacillus* jsou fylogeneticky spojeny s původním kladem (vývojová větev) *M. africanum* West African II (Huard et al. 2006).

3.7. Tuberkulóza

V průběhu historie lidstva byla považována za velmi obávané a nebezpečné onemocnění. O tom svědčí i řada lidových názvů, vyjadřujících postupné chátrání nemocného člověka a typický průběh nemoci – úbytě, souchotiny, bílý mor apod. Byla opředena i řadou mýtů a pověstí, např. název „královo zlo“ vyjadřuje mýtus šířený zejména v Anglii, že se TB vyléčí dotykem královské ruky.

V moderní době, po poznání původce TB a podstaty jejího šíření, je jednoznačně považována za „sociální nemoc“. Výskyt v jednotlivých oblastech světa se významně liší. V rozvojových a sociálně slabých státech patří TB mezi nejčastěji se vyskytující onemocnění (viz dále – Epidemiologie TB).

Etiologickým agens tohoto onemocnění je kterýkoliv z druhů komplexu *M. tuberculosis*. Onemocnění způsobená netuberkulózními druhy mykobakterií se nazývají mykobakteriózy.

3.7.1. Patogeneze a formy tuberkulózy

Při prvním kontaktu hostitele s *M. tuberculosis* vnikají mykobakteria inhalační cestou do plicních alveol, kde se množí. Vyvíjí se tuberkulózní specifický fokus a mykobakteria se šíří do regionálních lymfatických uzlin (Homolka 2016). Ty spolu s ložiskem zánětu v plicním parenchymu tvoří primární tuberkulózní komplex. Vyvíjí se primární tuberkulóza. V této době se také vytváří reaktivita na tuberkulin (alergická reakce IV. typu). V 90 % případů reaguje buněčná imunita organismu dostatečně a dochází ke spontánnímu zhojení. V místě nekrózy často vznikají kalcifikace a v organismu přetrvává ložisko tzv. latentní tuberkulózy (LTBI) (Homolka 2016). Perzistující formy mykobakterií zůstávají v ložisku v tzv. dormantní formě. Pokud primární komplex podléhá kazeifikaci, šíří se TB per continuitatem. Ve zbylých případech se během tvorby primárního komplexu šíří mykobakteria hematogenně buď v plicích anebo i do kteréhokoliv jiného orgánu, tak potom vzniká ložisko mimoplicní TB. Tento proces se nazývá primární progresivní TB. Nejzávažnější formy hematogenního rozsevu vyústí v miliární TB nebo TB meningitidu (bazilární meningitida). U osob s LTBI může po letech vlivem oslabení organismu vzniknout reaktivace tuberkulózního procesu. Tak vzniká tzv. postprimární TB. Postprimární TB může vzniknout také i novou exogenní reinfekcí (Homolka 2016).

3.7.2. Klinický obraz aktivní tuberkulózy

Tuberkulóza se projevuje nejprve nenápadnými, postupně nastupujícími příznaky. Typická je únava, vyčerpání, subfebrilie, především večer, zejména noční pocení, v pokročilých stádiích pak výrazná ztráta tělesné hmotnosti až kachektizace. Další projevy jsou typické podle lokalizace infekčního

procesu. Nejčastěji se vyskytující plicní forma je doprovázena kašlem, s pokračující nemocí je kašel produktivní, může docházet až k hemoptýze.

3.7.3. Imunogenicita *M. tuberculosis*

Imunita lidského organismu reaguje na přítomnost tuberkulózních mykobakterií mnohočetnými mechanismy. Imunita je aktivována specifickými složkami mykobakteriální buněčné stěny, obsahující dlouhé řetězce mastných kyselin, glykolipidů a lipoproteinů, a dalšími bakteriálními strukturami. Je aktivována vrozená i specifická imunita (Gagneux et Small 2007). Mezi významné imunogenní antigeny patří ESAT-6 (earlysecreted antigenic target protein 6 kDa) a CFP-10 (culture filtrate protein 10 kDa) (Handzel 2013), které se využívají v nepřímé diagnostice TB infekce, tzv. metodách IGRA (Interferon Gamma Release Assay).

3.7.4. Diagnostika tuberkulózy

Celý diagnostický proces bychom mohli popsat jako souhrn – mozaiku vyšetření klinických, laboratorních, vyšetření zobrazovacími technikami, kdy čím více kamenů do této mozaiky zapadá, tím je diagnostika tuberkulózy přesnější. Je to komplexní proces, na kterém se podílí řada oborů. Prvotní je klinické vyšetření pacienta (klinický obraz, objektivní i subjektivní nález), dále provedení zobrazovacích metod (radiologický nález, počítačová tomografie [CT], magnetická rezonance [MR] atd.), histopatologické vyšetření a zejména mikrobiologické vyšetření (Vašáková et al. 2016).

Podle WHO (2013) se za jednoznačně prokázanou TB považuje TB bakteriologicky ověřená, tedy TB pozitivní mikroskopicky, kultivačně nebo tzv. WRD testy, což jsou testy rychlé diagnostiky vč. molekulárních testů doporučené WHO. Mezi tyto WRD testy se řadí např. GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA). Za klinicky ověřenou TB se považuje každý případ, kdy kritéria bakteriologické ověřenosti naplněna nejsou, ale diagnóza aktivní TB je stanovena na základě jiných nálezů a je zahájena léčba. Vlastní laboratorní diagnostika TB bude probrána dále.

3.7.5. Léčba tuberkulózy

Správná léčba tuberkulózy je zárukou vyléčení pacienta, minimalizace šíření nemoci a minimalizace vzniku sekundární rezistence mykobakterií. Řídí se doporučenými standardními postupy jednotlivých zemí, vytvořenými podle doporučení WHO a odborných společností jednotlivých států. Aplikují se tzv. standardizované režimy pro definované skupiny pacientů.

Cílem správné antituberkulózní léčby (AT léčba) je vyléčit nemocného s tuberkulózou a zachovat kvalitu života a produktivitu, zabránit úmrtí na aktivní tuberkulózu a předejít pozdním následkům, zabránit relapsu onemocnění, minimalizovat možnost přenosu TB na ostatní, zabránit vzniku získané lékové rezistence (Zatloukal et al. 2016).

Pro zahájení léčby TB je důležité stanovit tzv. případ tuberkulózy podle definice uvedené ve standardních postupech České pneumoftizeologické společnosti ČLS JEP (Zatloukal et al. 2016):

„Definice případů TB:

1) **Podezření na tuberkulózu** – osoba s příznaky nebo znaky, které vzbuzují důvodné podezření na tuberkulózu

2) **Případ tuberkulózy** – definitivní případ tuberkulózy nebo nemocný, u něhož byla tuberkulóza stanovena specialistou PNE a bylo rozhodnuto o zahájení AT léčby.

Pozn.: Každý nemocný, léčený pro TB má být hlášen jako případ tuberkulózy. Tzv. „léčebný pokus“ antituberkulotiky nemůže být používán k diagnostice TB.

3) **Definitivní případ tuberkulózy** – nemocný, u něhož byl z klinického materiálu identifikován *Mycobacterium tuberculosis* komplex buď klasickou kultivací, nebo novější metodou, jako je molekulární LPA (line probe assay). (V zemích, kde není dostatečná laboratorní kapacita rutinně identifikovat *M. tuberculosis* je jedna pozitivita mikroskopického vyšetření na acidorezistentní tyčky rovněž pokládána za definitivní případ TB za předpokladu, že je prováděna externí kontrola kvality)

TB případy jsou také klasifikovány podle:

- 1) lokalizace tuberkulózního postižení (plicní, mimoplicní)
- 2) výsledek bakteriologického vyšetření (včetně rezistence na AT)
- 3) anamnéza předchozí léčby tuberkulózy
- 4) HIV status“ (Zatloukal et al. 2016).

Léčba TB je dlouhodobá a kombinovaná. Podle doporučení WHO probíhá v současné době standardně léčba TB v systému DOTS – Directly Observed Treatment Short Course (přímo kontrolovaná krátkodobá léčebná strategie). Znamená to, že léčba probíhá pod dohledem lékaře (minimalizace špatné compliance pacienta) a minimální dobu za přesně stanovené kombinace léků nutnou k maximálnímu efektu léčby.

V tuberkulózním procesu se vyskytují různé formy růstu mykobakterií a toto musí být zohledněno při volbě kombinace antituberkulotických přípravků. Podle Mitchisonovy teorie se v ložisku TB vyskytují populace mykobakterií aktivně rostoucí (převážně za přítomnosti velkého množství kyslíku v kavitách v zásaditém prostředí, extracelulárně), populace střídající období klidu a aktivního dělení (v uzavřených kazeózních ložiscích v neutrálním pH), populace pomalu rostoucích (oblasti s malým přístupem kyslíku a nízkým pH) a tzv. spící formy (dormanti), které přežívají i v podmínkách anaerobních, ale nemnoží se (Mitchison 1984). Za tzv. perzistory jsou považována mykobakteria, která jsou *in vitro* citlivá na léčiva, ale přesto jsou schopna přežít v makroorganismu i přes intenzivní terapii příslušným antituberkulotikem (McDermott 1958). Mezi perzistory patří zejména mykobakteria pomalu rostoucích populací. Ty pak mohou být pak zdrojem reaktivace TB.

Právě kombinace několika antituberkulotik zajišťuje efekt léčby na všechny formy. Kombinovaná AT léčba by měla mít tedy účinek baktericidní (usmrcení rychle rostoucích mykobakterií), sterilizační (usmrcení semidormantních mykobakterií) a také účinek vedoucí k zabránění selekce rezistentní populace (viz 3.8.5 Rezistence *M. tuberculosis*). K léčbě TB se využívají základní antituberkulotika

(AT) (viz dále). V případě nutnosti (rezistence k základním AT, komplikace zdravotního stavu pacienta apod.) je aplikována druhá řada AT a ATB.

Léčba TB probíhá ve dvou fázích. První je tzv. fáze iniciální (útočná) většinou v kombinaci 3–4 preparáty, trvající u nekomplikované TB 8 týdnů, a dále fáze pokračovací (zajišťovací) v kombinaci 2 preparátů po dobu několika měsíců. Fáze iniciační vede k podstatné eliminaci mykobakterií a k zahájení reparace postižené tkáně, fáze pokračovací pak k eliminaci méně metabolicky aktivních populací (Zatloukal et al. 2016).

Léčebné preparáty s antituberkulotickým účinkem jsou podle Cegielského et al. (2012) rozděleny do 11 kategorií na základě jejich chemické podobnosti a výskytu zkřížené rezistence. Jde o kategorie: isoniazid, rifamyciny (rifampicin, rifabutin, rifapentin), pyrazinamid, ethambutol, streptomycin, aminoglykosidy 2. řady (kanamycin, amikacin), cyklické polypeptidy (kapreomycin, viomycin), fluorochinolony (ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin), thioamidy (ethionamid, prothionamid), serinové deriváty (cykloserin, terizidon) a para-aminosalicylovou kyselinu.

K léčbě TB se používá kombinace antituberkulotik první řady – základní AT (viz dále). Při komplikacích léčby, kontraindikacích těchto AT a v případě rezistence kmene se léčba doplňuje, resp. nahrazuje léky (AT a ATB) druhé řady.

3.7.6. Rezistence *Mycobacterium tuberculosis*

Přirozená rezistence (intrinsic resistance) *M. tuberculosis* k většině antimikrobních látek je dána specifickým složením jejich buněčné stěny, produkcí betalaktamáz a schopností efluxu některých ATB (Kolyva et Karakousis 2012).

U *M. tuberculosis* nebyl dosud popsán horizontální přenos genů rezistence, jak tomu je např. u gramnegativních tyčinek. Získaná rezistence *M. tuberculosis* k antituberkulotikům je způsobena nejčastěji spontánními mutacemi v chromozomálních cílových genech (Gillespie 2002). Rezistentní populace se vyvíjejí selektivním růstem rezistentních populací (mutantů) a jsou šířeny v důsledku nesprávné terapie (Kolyva et Karakousis 2012). V každém ložisku tuberkulózní infekce je část mykobakterií rezistentní ke každému ze základních antituberkulotik (AT). Toto množství rezistentních mutant je odhadováno na 1% populace v ložisku a nazývá se „kritická proporce rezistentních zárodků“. Podle definice je kritická proporce procento tuberkulózních bacilů v inokulu rostoucí na kultivační půdě obsahující tzv. kritickou koncentraci daného antituberkulotika. Je-li růst vyšší než kritická proporce je AT klinicky neúčinné (Canetti et al. 1969, Cambau 2011). Tyto hodnoty byly stanoveny experimentálně pro jednotlivé druhy AT.

Rezistence tedy vzniká zejména následkem nesprávné terapie TB (nedostatečná délka terapie, dávka antituberkulotik, noncompliance pacienta apod.). Vznik rezistentní TB závisí na počtu tuberkulózních bacilů a počtu rezistentních mutant v ložisku. Vyšším počtem AT v kombinaci se množství kompletně rezistentních bacilů významně snižuje (viz dále – léčba TB). Primární rezistence

u pacientů se vyvíjí přenosem sekundárně rezistentního kmene na nového pacienta (Joshi 2011). Sekundární rezistence vzniká během léčby anebo u recidiv onemocnění (Cambau 2011). Rezistenci tuberkulózy je proto možné označit za „man-made problem“ (Reichman et al. 2014). Proto je rezistentní TB tak velkým problémem v zemích s nedostatečným programem kontroly TB (diagnostika, léčba, epidemiologie...).

Základ k výzkumu rezistence u *M. tuberculosis* poskytl výzkum rezistence u nespécifických bakterií. Rezistentní kmeny *E. coli* mají missense mutace (mění kódovanou aminokyselinu) a krátké delece na genu *rpoB*. Později bylo popsáno dalších 17 mutací v této lokalizaci. Tento výzkum na *E. coli* položil základ pro molekulárně genetické studie týkající se mutací na *rpoB* genu v souvislosti s rezistencí mykobakterií k RIF (Musser 1995). Přes tuto skutečnost Gagneux et al. (2006b) uvádějí, že tyto mutace nemusí nezbytně vést k manifestní rezistenci k RIF. V těchto případech pravděpodobně existují kompenzační mutace, které u *E. coli* byly již popsány (Reynolds 2000).

Pro jednotlivá antituberkulotika jsou stanoveny tzv. kritické koncentrace. Představují nejnižší koncentraci léku inhibující kmeny, které nikdy nebyly v kontaktu s antituberkulotikem (tzv. divoké kmeny) u pacientů reagujících na léčbu klinickým zlepšením (Richter et al. 2009). Tyto koncentrace uveřejňuje a doporučuje WHO a ECDC (European Center for Disease Prevention and Control). Využívají se pro testování citlivosti izolátů *M. tuberculosis*, kdy se porovnává růst kmene na půdě s kritickou koncentrací AT a na půdě bez AT. Obecně lze říci, že standardizace metod pro testování citlivosti *M. tuberculosis* je obtížná kvůli rozdílné účinnosti jednotlivých léčiv v různých typech médií a v různých metodách.

3.7.7. Typy rezistence *Mycobacterium tuberculosis*

Jako primární rezistence *M. tuberculosis* je označována situace, kdy je kmen *M. tuberculosis* rezistentní k některému z antituberkulotik u pacienta, který byl tímto kmenem primárně infikován, tedy aniž by se kdy na TB léčil déle než 1 měsíc. Někdy bývá označována také jako „rezistence u nových onemocnění“ (Vashakidze et al. 2009).

Sekundární rezistencí je označována rezistence u kmene od pacienta, který byl již někdy v minulosti léčen antituberkulotiky déle než jeden měsíc (Vashakidze et al. 2009). Předcházející léčba tedy zahrnuje případy relapsů, léčby po dřívějším selhání terapie a případy po nesprávné léčbě, event. i chronické případy onemocnění (Vashakidze et al. 2009).

Podle množství a typů rezistentních antituberkulotik jsou rezistentní kmeny *M. tuberculosis* děleny do několika skupin – viz tabulka 3 (Vashakidze et al. 2009).

Tabulka 3 – Přehled typů rezistence *Mycobacterium tuberculosis*

Typ rezistence	Popis
monorezistence	rezistence ke kterémukoliv jednomu ze základních AT
polyrezistence	rezistence ke dvěma a více AT první řady, ale nikoliv současně k INH a RIF
multirezistence (MDR multi drug resistant)	rezistence současně k INH a RIF (a dále event. i k dalším AT)
extenzivní rezistence (XDR extensively drug resistant)	rezistence MDR (tedy INH+RIF) a současně rezistence k fluorochinolonům (minimálně k jednomu z nich) a dále současně k jednomu ze tří injektabilních antibiotik druhé řady (amikacinu, kanamycinu nebo capreomycinu)

Hlavním markerem pro detekci MDRTB je rezistence k RIF, protože 90 % izolátů rezistentních k RIF je rezistentních také k INH (Mani et al. 2001, Somoskovi et al. 2001)

Je používán i termín TDR (totally drug resistant). Tato kategorie ovšem nebyla dosud oficiálně uznána a definována WHO (Cegielski et al. 2012). V tomto případě je kmen *M. tuberculosis* rezistentní ke všem známým AT a ATB. Tyto kmeny se vyskytly dosud jen výjimečně v Íránu, v Indii a v dalších několika zemích (Ahmed et al. 2016). Definování této skupiny je podle WHO (WHO 2017) obtížné z mnoha důvodů. Jednak jde o rozdíl ve výsledcích testů citlivosti *in vitro* a účinkem léků *in vivo* u nových a méně používaných ATB. Dále jde o vývoj nových léků, u kterých není jejich účinek vůči *M. tuberculosis* přesně popsán a doložen a není u nich ani přesně definována kritická koncentrace. V rutinní praxi bývá testováno většinou 1 AT z každé AT kategorie (viz dále), přičemž citlivost kmene u jednotlivých zástupců každé kategorie nemusí být nutně stejná. Dalším faktem je, že neexistuje přesný konsensus v seznamu všech léků s antituberkulózním účinkem (Cegielski et al. 2012).

U isoniazidu a ethambutolu je rozlišován nízký a vysoký stupeň rezistence. Toto je dáno přítomností konkrétní mutace. U isoniazidu mutace v inhA vede k tzv. nízkému stupni rezistence (low level resistance), tedy rozmezí MIC 0,1–1,0 mg/l (Palomino et Martin 2014). Zároveň přítomnost této mutace udává zkříženou rezistenci k ethionamidu (ETH) (viz dále). Mutace v katG vede k rezistenci vysokého stupně (high level resistance) u isoniazidu, MIC je zde >1 mg/l (Palomino et Martin 2014).

Studie vycházející z celogenomové sekvenace prokazují, že mutace kódující rezistenci jsou spojeny s kompenzačními mutacemi jinde v genomu *M. tuberculosis*, které vedou k tomu, že onemocnění TB může být spojeno s fyziologickými a strukturálními změnami výsledných bílkovin v buňkách mykobakterií. To zvyšuje možnost, že rezistence vůči AT by mohla mít vliv na mikroanatomickou strukturu a antigenní specifitu, následně tedy i na imunitní odpověď T-buněk (Dheda et al. 2014).

4. Antituberkulotika a mechanismy jejich rezistence

Přehled mutací odpovědných za rezistence u jednotlivých antituberkulotik a antibiotik je souhrnně uveden v tabulce č. 4.

Tabulka 4 – Mechanismus rezistence u AT a ATB, jejich MIC (převzato z da Silva et Palomino 2011)

preparát	MIC (mg/l)	Gen	Role produktu genu
Isoniazid	0.02–0.2 (7H9/7H10)	<i>katG</i>	kataláza/peroxidáza
		<i>inhA</i>	enoyl reduktáza
		<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxid reduktáza
		<i>kasA</i>	β-ketoacyl-ACP syntáza
Rifampicin	0.05–0.1 (7H9/7H10)	<i>rpoB</i>	β-podjednotka RNA polymerázy
Pyrazinimide	16–50 (LJ)	<i>pncA</i>	pyrazinamidáza
Streptomycin	2–8 (7H9/7H10)	<i>rpsL</i>	S12 ribozomální protein
		<i>rrs</i>	16S rRNA
		<i>gidB</i>	7-methylguanosine methyltransferáza
Ethambutol	1–5 (7H9/7H10)	<i>embB</i>	arabinosyl transferáza
Fluorochinolony	0.5–2.0 (7H9/7H10)	<i>gyrA/gyrB</i>	DNA gyráza
Kanamycin/amikacin	2–4 (7H9/7H10)	<i>rrs</i>	16S rRNA
Capreomycin/viomycin	2–4	<i>tlyA</i>	rRNA methyltransferáza
Ethionamide	10 (7H11)	<i>inhA</i>	enoyl reductáza
<i>p</i> -amino salicylic acid	0.5 (LJ)	<i>thyA</i> <i>dfrA</i> <i>folC</i>	thymidylate syntháza A folát reduktáza/syntáza
		<i>nhoA.acc</i>	acetyltransferáza
PA-824 and OPC-67683	0.03 (7H9/7H10)	Rv3547	hypothetical 16.4 kDa
TMC207	0.03 (7H9/7H10)	<i>atpE</i>	ATP syntháza
Cycloserine		<i>alr</i>	D-ala ligáza
		<i>ddlA</i>	racemáza
		<i>cycA</i>	
Prothionamid		<i>inhA</i>	enoyl reductáza
		<i>ethA</i>	aktivátor monooxygenázy

4.1. Základní antituberkulotika

Skupinu základních antituberkulotik tvoří pět antituberkulózních preparátů: streptomycin (STM), isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol (EMB) a pyrazinamid (PZA). Tyto léky jsou používány k léčbě infekcí způsobených druhem *M. tuberculosis* komplexu jako léky první volby. Rezistence mykobakterií ke každému z těchto AT je spojena s výskytem bodových mutací, delecí nebo inzerací (Marques da Silva et al. 2013). V léčebné kombinaci má každé ze základních AT svoji úlohu. INH je odpovědný za likvidaci maximálního počtu mykobakterií v iniciální fázi léčby (95 % mikroorganismů během 2 dnů léčby). Jeho baktericidní účinek je pak nahrazen RIF a PZA v intenzivní fázi. Ve fázi

pokračující (kombinace RIF+INH) je RIF jediným preparátem účinkujícím na tzv. perzistory. EMB slouží jako AT bakteriostaticky působící (Mitchison 2000).

4.1.1. Streptomycin

Streptomycin byl objeven jako druhé antibiotikum po penicilinu v roce 1943 Albertem Schatzem z aktinobakterie *Streptomyces griseus*. Bylo to první antibiotikum, které účinkovalo na mykobakterie. K léčbě TB se používalo od roku 1947. Bohužel brzy po zavedení tohoto antibiotika do léčby TB se objevily první rezistence jako důsledek monoterapie STM (Palomino et Martin 2014).

Je to baktericidní antibiotikum patřící do skupiny aminoglykosidů. Je podáván parenterálně (intramuskulárně). Při svém účinku inhibuje syntézu proteinů vazbou na malou 30S podjednotku prokaryotického ribozómu. Po napojení aminoglykosidu na rRNA dojde ke změně čtení kodonů a nedochází k elongaci polypeptidového řetězce (Majumder et al. 2007, Zhang et Yew 2015). Ačkoliv patří STM mezi aminoglykosidy, zkřížená rezistence mezi jím a dalšími (kanamycin, amikacin) se vyskytuje zřídka vzhledem k odlišnému mechanismu rezistence (Kolyva et Karakousis 2012).

STM působí především na extracelulárně uložené proliferující mykobakterie v minimální inhibiční koncentraci (MIC) 2–4 mg/l, jeho vliv na klidové formy a intracelulárně uložená mykobakteria je minimální (Zhang et Yew 2009). Má řadu nežádoucích účinků, působí nefrotoxicky, ototoxicky, neurotoxicky.

Mechanismus rezistence

U ostatních klinicky významných bakterií se u STM uplatňuje ireverzibilní streptomycinový typ rezistence (single step). Nejběžnější mechanismus rezistence je exprese enzymů potlačujících účinek STM, přičemž tyto enzymy jsou kódovány plasmidy. U mykobakterií ovšem tento mechanismus dosud popsán nebyl (Majumder et al., 2007). U *M. tuberculosis* byly mutace související s rezistencí popsány na dvou místech – na genu *rrs* kódujícím 16S podjednotku rRNA a na genu *rpsL* kódujícím ribozomální protein S12 (Zhang et Yew 2015). Nejčastější mutací na *rpsL* je substituce na kodonu 43 z lysinu na arginin, K43R (Sreevatsan et al. 1996, Zhang et Yew 2015, Kolyva et Karakousis 2012), další častou mutací je změna na kodonu 88 (K88Q) – změna z lysinu na glutamin (Sreevatsan et al. 1996, Zhang et Yew 2009, Palomino et Martin 2014). Mutace genu *rrs* se objevuje na smyčce 16S rRNA a je lokalizována do dvou regionů v okolí nukleotidů 530 a 915 (Zhang et Yew 2009, Palomino et Martin 2014). Mutace na genech *rrs* a *rpsL* vedou k vysoké rezistenci vůči STM – MIC > 1000 mg/l nebo k rezistenci střední MIC 64–512 mg/l (Kolyva et Karakousis 2012, Sreevatsan et al. 1996). 20–30 % kmenů rezistentních k STM ovšem nemá ani jednu z těchto dvou mutací. Tyto kmeny vykazují nízkou rezistenci k STM (MIC <32 mg/l). Tato rezistence je způsobena mutací v genu *gidB* kódujícím 7-methylguanosine m(7)G methyltransferázu specifickou pro 16S rRNA. Další mutace mohou přispívat ke zkříženým rezistencím mezi ostatními aminoglykosidy (např. mutace v promotoru genu *whiB7*) (Zhang et Yew 2015). Na rozdíl od jiných bakterií má *M. tuberculosis* pouze jednu kopii rRNA

operonu a tedy při změně jednoho nukleotidu v rRNA může tato vyústit ke vzniku rezistence (Musser, 1995).

4.1.2. Isoniazid

Isoniazid neboli hydrazid kyseliny nikotinové (isonicotinhydrazide) je používán k léčbě TB od roku 1950. Strukturně je blízký ethionamidu a pyrazinamidu (Kolyva et Karakousis 2012). V současné době tvoří spolu s rifampicinem základ antituberkulotické léčby, oba tyto léky působí na metabolicky aktivní množící se mykobakteria. Na netuberkulózní mykobakterie je většinou neúčinný.

INH primárně interferuje s tvorbou buněčné stěny mykobakterií, inhibuje syntézu mykolových kyselin (Kolyva et Karakousis 2012). V některých studiích je popsána také inhibice syntézy nukleových kyselin, fosfolipidů nebo metabolismu NAD (Marques da Silva et al. 2013). V buňkách mykobakterií se INH váže na dva cíle – struktury nezbytné k syntéze mykolových kyselin: *InhA* kódující NADH-dependentní enoyl-acyl transportní protein reduktázu (ACP) a *KasA* (β -ketoacyl-ACP syntáza). Mutace bývají nacházeny v promotorech nebo méně často v genech kódujících tyto proteiny (*inhA*, *acpM*, *kasA*). Úloha mutace v *kasA* není v souvislosti s rezistencí vůči INH dosud objasněna, protože se objevuje i u citlivých izolátů (Marques da Silva et al. 2013).

Výzkum mechanismů účinku i rezistence INH byl zahájen Middlebrookovým objevem v roce 1954. Odhalil, že organismy rezistentní k INH mají sníženou katalázovou aktivitu. Byla přijata hypotéza, že účinek INH je zvyšován účinkem mykobakteriální katalázy a peroxidázy (Musser, 1995), INH je tímto enzymem oxidován in vivo z formy neaktivní do formy aktivní (Johnsson et al. 1997, Zhang et al. 1992, Lorenzo et Mousa 2011). Citlivost k INH je tedy u *M. tuberculosis* zprostředkována produktem genu *katG*, který kóduje produkci enzymu hémová kataláza-peroxidáza, a tím převádí INH do aktivní účinné formy (Heym et al. 1993, Johnsson et al. 1997, Arbex et al. 2010a, Da Silva et Palomino 2011).

Při nižších koncentracích působí INH bakteriostaticky, při vysokých pak baktericidně (3–5× vyšší koncentrace než je hraniční koncentrace (break point BP). BP pro *M. tuberculosis* je 0,02–0,20 mg/l. Působí na aktivně rostoucí intra i extracelulární mykobakterie, na mykobakterie rostoucí pomalu nebo intermitentně má velmi omezený efekt, na tzv. perzistory nepůsobí vůbec (Arbex et al. 2010a, Zang et Yew 2009, Zhang et Yew 2015).

Průnik INH do tkání a tělních tekutin je velice dobrý. Je metabolizován v játrech acetylací pomocí N-acetyltransferázy na acetyl-isoniazid a dále na mono-acetyl hydrazin (MAH). Biologický poločas je dán geneticky. U osob s rychlou acetylací je cca 1 hodina u pomalých acetylátorů cca 3–4 hodiny. Metabolity, většinou inaktivní, se vylučují močí (70–96 %), zbytek stolicí (WHO, 2010, Arbex et al. 2010a). Podává se perorálně, u těžkých průběhů onemocnění jej lze podat i parenterálně (intramuskulárně i intravenózně). K vedlejším účinkům tohoto preparátu patří výrazná hepatotoxicita, dále neurotoxicita, obtížná tolerance gastrointestinálního traktu a deficit pyridoxinu, jehož preventivní podávání při léčbě snižuje neurotoxicitu. Za poškození jaterních buněk je

pravděpodobně zodpovědný konečný metabolit MAH, riziko hepatitidy indukované léčbou INH je větší než riziko vzniklé aktivní konzumací alkoholu (Schluger 2008).

INH je charakteristický rychlým vznikem rezistence mykobakterií při monoterapii. V monoterapii jej lze použít pouze při tzv. chemoprophylaxi k léčbě latentní tuberkulózní infekce (LTBI) (WHO, 2010, Arbex et al. 2010a).

Mechanismus rezistence

Rezistence k INH u *M. tuberculosis* je vázaná na gen *katG*, který kóduje současně katalázu a peroxidázu (Heym et al. 1999). KatG je umístěn na nestabilním regionu genomu *M. tuberculosis*, kde se vyskytuje mnoho mutací měnících aminokyselinu (missense mutation) i mutací tichých, dále inzercí, delecí apod. (Kolyva et Karakousis 2012). Proto gen *katG* a variabilní mutace v něm generují různou intenzitu rezistence podle odchylky funkce genu. To se projeví různou MIC kmene v rozmezí např. 0,2–256 mg/l (Kolyva et Karakousis 2012). Nejčastější vyskytující se mutací je substituce S315T (změna serinu na threonin), kterou nacházíme u 50–90 % rezistentních kmenů (Laurenzo et Mousa 2011), která bývá spojená s vysokou rezistencí (MIC >1.0 mg/l) a která se objevuje více u MDR kmenů (Palomino et Martin, 2014). Mutace v tomto genu významně snižuje schopnost aktivace pro-INH katalázu/peroxidázu. U některých vysoce rezistentních kmenů bylo dokonce zjištěno chybění tohoto genu (Zhang et al. 1992). Nelze ovšem říci, že mezi chyběním genu *katG* a výskytem vysoké rezistence panuje přímá závislost (Musser 1995). Mutace v genu *katG* je považována za hlavní mechanismus INH rezistence.

Dalším výzkumem bylo zjištěno, že na rezistenci k INH má vliv také změna na genu *inhA* (Heym et al. 1999) nebo jeho promotoru – regionu *mabAinhA*, druhá nejčastější mutace (způsobuje nadměrnou expresi genu *inhA*). Nejčastější mutace je na pozici C15T (cystein na threonin), mutace na *inhA* je častěji spojena s nízkou rezistencí k INH (MIC 0,2–1,0 mg/l) (Palomino et Martin 2014, Zhang et Yew 2009). Bylo prokázáno, že mutace na genu *inhA* způsobuje nejen rezistenci k INH, ale také ke strukturálně příbuznému antituberkulotiku – ethionamidu (ETH), u něhož sdílí stejný cíl (Banerjee et al. 1994). Z recentních studií vyplývá, že mutace regulátorového regionu v *inhA* spolu s mutací kódujícího regionu *inhA* (tzv. *inhA* double mutation) způsobují nízkou rezistenci k INH a zkříženou rezistenci k ETH (Machado et al. 2013). Sekvenční analýzou bylo zjištěno, že kmeny *M. tuberculosis* rezistentní k INH mají změněnou jednu nukleotidovou bázi (T na G v nukleotidu 280, která způsobí změnu aminokyseliny (Ser-94 na Ala-94) (Musser 1995).

V rezistenci k INH se pravděpodobně uplatňují i další mechanismy, většina těchto mechanismů ještě není plně prozkoumána, např. *oxyR-ahpC*, *furA-katG* (Laurenzo et Mousa 2011, Palomino et Martin 2014). Například mutace v genu *ahpC*, kódujícím alkyl hydroperoxid reduktázu, by mohla být podle posledních výzkumů jakýmsi náhradním markerem pro detekci rezistence k INH, protože mutace v promotoru *ahpC* je kompenzační mutací ke ztrátě aktivity katalázy/peroxidázy a sama tak rezistenci k INH nezpůsobuje (Rinder et al. 1998).

Obecně bychom mechanismus rezistence vůči INH mohli popsat jako mutace v několika genech, a to *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, z nichž *katG* a *inhA* jsou ty hlavní (Palomino et Martin 2014).

4.1.3. Rifampicin

Toto antituberkulotikum bylo objeveno v roce 1966, bylo izolováno ze *Streptomyces mediterranei*. Do léčby TB bylo zařazeno v roce 1971, díky kombinační léčbě více preparáty vč. RIF se mohl léčebný režim zkrátit na 9 měsíců (Davidová 2001). Jde o semisyntetický derivát rifamycinu, v anglické literatuře je označován jako rifampin. Molekulární mechanismy účinku rifampicinu (RIF) byly zkoumány na bakterii *Escherichia coli*, kde se RIF váže na β podjednotku RNA polymerázy a výsledkem této vazby je inhibice transkripce.

U mykobakterií spočívá účinek RIF také v inhibici transkripce a elongace RNA navázáním na DNA dependentní RNA polymerázu, která se tímto inaktivuje. RIF zde účinkuje baktericidně a má také sterilizační efekt na mykobakterie v intra i extracelulárním prostředí, ve fázi aktivního růstu i ve fázi stacionární (WHO 2010, Arbex et al. 2010a, Zhang et Yew 2009). Kritická koncentrace pro *M. tuberculosis* je 0,05–1,0 mg/l v tekutých médiích, ovšem na vaječných půdách je vyšší – 40,0 mg/l (Van Deun et al. 2013). Za citlivé se považují kmeny s MIC v tekutých a na agarových médiích do 1,0 mg/l a na Löwenstein-Jensenově půdě do 40 mg/l (Zhang et Yew 2009).

Většina RIF (85 %) je metabolizována v játrech, 60–65 % je vylučováno žlučí, 6–15 % je vyloučeno v nemetabolizované formě a zpětně resorbováno ve střevě, malé množství je vylučováno močí (Arbex et al. 2010a). RIF je pevná a intenzivně červená látka. Malé množství metabolitů, které se dostane do tělesných tekutin, je oranžově zbarví (moč, pot, slzy). RIF může být podáván orálně, ze zažívacího traktu se dobře vstřebává, i parenterálně (i.v.).

Mezi hlavní nežádoucí účinky rifampicinu patří hepatotoxicita, která se zvyšuje při současném podání INH. RIF má i řadu dalších nežádoucích účinků (např. trombocytopenie, vomitus, flu-like syndrom), je silným induktorem cytochromu P450 a tím vykazuje řadu lékových interakcí, např. s orálními kontraceptivy, perorálními antidiabetiky, digoxinem apod. (Davidová 2001, Schluger 2008).

Mechanismus rezistence

U rifampicinu vzniká rezistence velmi rychle (tzv. single step, streptomycinový typ) s vysokým stupněm. Mutace se může objevit spontánně s frekvencí 10^{-9} (Mani et al. 2001). Více než 95 % rezistentních izolátů *M. tuberculosis* obsahuje bodovou mutaci v centrálním regionu genu *rpoB* (Telenti et al. 1993) – 81-bp rifampin resistance-determining region – RRDR, zvaný hot-spot region, mezi kodony 507 a 533, nejčastěji s mutacemi na kodonu 531 a 526 (Kolyva et Karakousis 2012). Gen *rpoB* kóduje β -podjednotku RNA polymerázy (Mani et al. 2001, Marques da Silva et al., 2013, Lorenzo et Mousa 2011). Tato lokace odpovídá kodonům 507–533 u *E. coli*. Změny v *rpoB* byly popsány jak ve smyslu substituce, tak delece i inserce (Mani et al. 2001). Právě tento fakt dovoluje aplikovat průkaz *rpoB* do rutinní diagnostiky k průkazu rezistence k RIF a potažmo tak k průkazu

skupiny MDRTB, také i v rámci programu kontroly tuberkulózy. Ne všechny mutace v 81-bp regionu genu vedou ke stejnému stupni rezistence. Vysoký stupeň rezistence k RIF je způsoben mutací v kodonu 526 (H526P/D/Y) a 531 (S531L), MIC je zde >64 mg/l. K nízkému stupni rezistence vedou pak mutace v kodonu 511 (L511P), 516 (D516V), 519 (N518K) a 522 (S522L), MIC <64 mg/l (Laurenzo et Mousa 2011). Obecně nejčastější mutace v genu *rpoB* vedou k vysoké rezistenci a zkrřížené rezistenci ke všem rifamycinům, specifické mutace způsobující nízkou rezistenci (kodony 511, 516, 518, 522) nemají vliv na citlivost k rifabutin a rifalazilu (Zhang et Yew 2009). V genu *rpoB* se mohou vyskytovat i další mutace, které ovšem na rezistenci nemají vliv (např. E510H, L511P, D516Y, ...) (Zhang et Yew 2015).

Pouze 5 % kmenů rezistentních k RIF neobsahuje mutaci v *rpoB* genu. Rutinní molekulární testy detekují mutace právě regionu genu 81-bp, ale v určitých případech byly popsány rezistentní kmen s mutacemi v kodonu 149 (V149F) nebo i v jiných kodonech, jejichž prevalence není dosud jasná (Laurenzo et Mousa 2011).

V roce 1990 popsal Nakamura et al. kmen *M. tuberculosis* od pacienta s mikroskopicky pozitivní TB, který byl charakterizován velmi špatným růstem na kultivačních půdách. Podrobnějším zkoumáním se zjistilo, že tento kmen roste mnohem lépe v přítomnosti rifampicinu. Kmen byl označen jako rifampicin dependentní (Nakamura et al. 1990). Tyto kmeny mohou být velmi závažným nálezem u pacientů. Nejenže léčba rifampicinem nevede k úzdavě, ale dokonce použití rifampicinu a dalších rifampinových derivátů vede k progresi onemocnění. Pro úspěšnou léčbu je nezbytné takovýto kmen rychle odhalit a RIF vyloučit z léčebného schématu. Závislost kmene na rifampicinu může být absolutní (bez přítomnosti RIF kmen neroste na kultivačních médiích vůbec), nebo relativní (slabý růst in vitro je RIF stimulován) (Zhong et al. 2010). Mechanismus dependence na RIF byl objasněn u *E. coli*. Závislost je způsobena mutací na *rpoB* a současně dalšími přídatnými mutacemi, např. F584S (Zhong et al. 2010). RIF dependentní mykobakterie vykazují určitou podobnost s tzv. L-formami bakterií (Zhang et Yew 2009).

Tento fenomén je nutné brát v úvahu při diagnostice a nepodceňovat jeho výskyt. Při laboratorní diagnostice mohou na tuto situaci upozornit přímé testy citlivosti, tj. detekce mutací rezistence k RIF ze vzorku (Zhong et al. 2010). Při podezření na tento fenotyp je nutné zařadit do diagnostiky kultivační půdu s obsahem RIF.

Monorezistence k RIF je poměrně vzácná, většinou jsou kmeny *M. tuberculosis* rezistentní současně i k INH (ca 90 %) (Kolyva et Karakousis 2012). Rezistence k RIF je používána jako náhradní marker pro detekci MDR TB, např. v oblastech s omezenými diagnostickými možnostmi.

4.1.4. Ethambutol

Ethambutol byl vyroben synteticky v roce 1961 a v roce 1966 byl zařazen do rutinní léčby TB (Arbex et al. 2010a). Jde o dusíkatý alkohol. Působí bakteriostaticky na mykobakterie intra i extracelulárně, ale především na aktivně rostoucí populace (Kolyva et Karakousis 2012, Arbex et al. 2010a). Na

perzistující růstově neaktivní formy je neúčinný, sterilizační účinek je tedy minimální (Zhang et Yew 2009). Molekulární účinky EMB nejsou detailně známe, ale experimentálně bylo zjištěno, že EMB inhibuje stavbu buněčné stěny – metabolismus RNA, syntézu fosfolipidů, přenos mykologických kyselin do buněčné stěny, interferuje s biosyntézou arabinogalaktanu, základního polysacharidu bakteriální stěny (Musser 1995, Arbex et al. 2010a, Marques da Silva et al. 2013). EMB inhibuje enzym arabinosyltransferázu, který je kódován genem *embB* a který zprostředkovává polymerizaci arabinózy na arabinogalaktan (Laurenzo et Mousa 2011, Sreevatsan et al. 1997b). U *M. tuberculosis* je *embB* uspořádán v operonu spolu s *embC* a *embA* v sestavě *embCAB*. *EmbC*, *embB* a *embA* sdílejí více než 65 % identických aminokyselin a předurčují kódování transmembránových proteinů (Zhang et Yew 2009).

EMB se dobře resorbuje, váže se na erytrocyty, má dobrou distribuci do tkání. Metabolizován je v játrech, vylučuje se převážně ledvinami, asi 20 % je vylučováno stolicí v nezměněné formě (WHO, 2010, Arbex et al. 2010a). Podává se perorálně. Kritická koncentrace pro *M. tuberculosis* je 1–5 mg/l. Ve vyšších dávkách působí baktericidně (Arbex et al. 2010a)

EMB má také nežádoucí účinky, při léčbě může vzniknout retrobulbární neuritida s poruchami vidění a barvocitu.

Mechanismus rezistence

Rezistence *M. tuberculosis* k EMB je spojena s bodovou mutací v operonu genu *embCAB*, konkrétně v *embB*, příležitostně pak v *embC* (Belanger, 1996, Zhang et Yew 2009, Palomino et Martin 2014, Sreevatsan et al. 1997b). Byla zjištěna nenáhodná silná souvislost mezi mutací – substitucí aminokyseliny na pozici 306 *embB* (methionin) a stupněm rezistence k EMB (Kolyva et Karakousis 2012, Sreevatsan et al. 1997b, Telenti et al. 1997). Kmeny s mutacemi M306L (methionin na leucin) a M306V (methionin na valin) mají MIC vyšší 40 mg/l, s mutací M306I (methionin na isoleucin) MIC 20 mg/l (Karakousis 2009). V recentních studiích bylo ale odhaleno, že existují i citlivé kmeny s touto mutací, což vede k závěru, že mutace na pozici 306 *embB* by mohla být spíše predispozicí k vývoji rezistence k EMB (Palomino et Martin 2014). Hlavní úlohu v rezistenci hraje změna na genu *embB* (Arbex et al. 2010a), nejpravděpodobnější mechanismus rezistence k EMB je nadměrná exprese nebo strukturální alterace *emb* proteinů, přesněji *embB* (Laurenzo et Mousa 2011). Na vzniku rezistence se také mohou podílet specifické mutace na kodonech 330 a 630 *embB* (Telenti et al. 1997) nebo 497, nebo 406 (Xu et al. 2015). 30 % rezistentních kmenů nemá na *embB* žádnou mutaci, což komplikuje rutinní diagnostiku rezistentních kmenů molekulárně-genetickými metodami (Zhang et Yew 2015, Palomino et Martin 2014).

Rezistenci k EMB může způsobovat také např. mutace v genu *ubiA* kódujícího decaprenyl-phosphate 5-phosphoribosyltransferázu DPPR syntázu, která je důležitá při syntéze buněčné stěny. Pokud je tato mutace přítomná současně s mutací v *embB*, vykazuje kmen vysokou rezistenci vůči EMB (Safi et

al. 2013, Xu et al. 2015, Zhang et Yew 2015) Rezistentní kmeny mají většinou MIC >7,5 mg/l (Zhang et Yew 2009).

Další mutace uplatňující se v rezistenci k EMB jsou např. substituce na genu *embR* Q379R (glutamin změněn na arginin) nebo mutace na genech *rmlD*, *rmlA2* a *Rv0340* (Kolyva et Karakousis 2012). Zhruba jedna čtvrtina kmenů rezistentních k EMB ovšem nevykazuje žádnou z výše uvedených mutací. Lze proto předpokládat, že se na rezistenci k EMB podílejí další dosud nepoznané mechanismy (Karakousis 2009).

4.1.5. Pyrazinamid

Pyrazinamid byl poprvé syntetizován v roce 1936, ale pro léčbu TB je používán od roku 1952 (Arbex et al. 2010). Chemicky se jedná o derivát pyrazinu, syntetický analog nikotinamidu příbuzný s INH. Také podobně jako INH je v primární formě neaktivní a je aktivován mykobakteriálním enzymem nikotinamidázou/pyrazinamidázou (kódována genem *pncA*) na aktivní kyselinu pyrazinkarboxylovou (POA) (Marques da Silva et al. 2013, Somoskovi et al. 2001, WHO, 2010, Arbex et al. 2010).

Ve svém účinku je PZA slabší než INH, účinkuje baktericidně na intracelulárně uložená mykobakteria. Vliv PZA se uplatňuje až po delší době léčby (14 dnů) (Mitchison, 2000, Arbex et al. 2010). Má výborný sterilizační efekt na semidormantní formy mykobakterií (Somoskovi et al. 2001) a dokonce v omezené míře i na dormantní formy v kyselém prostředí tuberkulózní léze (Doležal et al. 2008, Zhang et Yew 2009). Na rozdíl od ostatních základních AT neúčinkuje na rostoucí a aktivně se množící formy mykobakterií (Zhang et Yew 2015). *M. tuberculosis* se vyznačuje vysokou vnímavostí k PZA, protože postrádá schopnost efluxu POA kyseliny z buňky. Pro aktivitu PZA je nezbytné kyselé prostředí, které usnadňuje vznik protonizované pyrazinkarboxylové kyseliny a její průnik přes membránu (Zhang et Mitchison 2003b). Protonovaná POA je absorbována do mykobakteriální buňky v kyselém prostředí, v ní je akumulována kvůli nedostatečnému efluxu a způsobí tak buněčné poškození. PZA nemá na rozdíl od ostatních AT přesně definovaný cíl působení (Zhang et Mitchison 2003b). Protože kyselé prostředí vzniká v místě aktivního zánětu díky produkci kyseliny mléčné zánětlivými buňkami, je aktivita PZA mnohem větší *in vivo* než *in vitro* za standardních laboratorních podmínek (tedy bez acidifikace prostředí) (Zhang et Mitchison 2003b).

Cílovým místem působení pyrazinamidu a pyrazinkarboxylové kyseliny je tedy buněčná membrána, ve které dojde k narušení její funkce a membránového transportu (Doležal et al. 2008). Kritická koncentrace pro *M. tuberculosis* je 6,25–50,0 mg/l při pH 5,5 (Arbex et al. 2010). PZA účinkuje pouze na *M. tuberculosis*, *M. africanum* a *M. microti*. *M. bovis* je k PZA přirozeně rezistentní (včetně vakcinačních kmenů BCG), protože nemá pyrazinamidázu, v genu *pncA* obsahuje bodovou mutaci C169G v porovnání s genem u *M. tuberculosis*, což vede ke změně aminokyseliny na pozici 57 v sekvenci *pncA* (změna z histidinu u *M. tuberculosis* na kyselinu asparagovou u *M. bovis*) (Zhang et Mitchison 2003b, Zhang et Yew 2009).

PZA je aplikován perorálně, jeho resorpce a distribuce do orgánů a tělních tekutin je velmi dobrá. Metabolizuje se ve 40 % a vylučuje se ledvinami. Jeho nežádoucí účinky se projevují hepatotoxicitou, hyperurikémií, obtížemi gastrointestinálního traktu. Při použití v kombinaci s RIF zkracuje antituberkulózní léčbu z jednoho roku na 6 měsíců (Somoskovi et al. 2001).

Mechanismus rezistence

Rezistence k PZA je spojena s mutací pravděpodobně v promotoru regionu nebo ve strukturálním genu *pncA*, který kóduje pyrazinamidázu. Většina mutací (bodové, delece a inserce) byla popsána na regionu 561-bp ORF (open reading frame – otevřený čtecí vzorec) nebo na regionu zdánlivého promotoru 82-bp (Kolyva et Karakousis 2012, Arbex et al. 2010, Lorenzo et Mousa 2011, Zhang et al. 2003a). Kmeny rezistentní k PZA ztrácejí pyrazinamidázovou/nikotinamidázovou aktivitu (Zhang et Yew 2009). Mutace v *pncA* genu jsou velmi různorodé a rozptýlené v celém genu, což je pro rezistenci k PZA jedinečné (Zhang et Yew 2009). Asi 3 % kmenů rezistentních k PZA tuto mutaci nemají, tudíž zde je předpoklad, že existují i jiné mechanismy rezistence pro PZA (Marques da Silva et al. 2013). Přestože je PZA molekulárně podobný INH, neexistuje zkřížená rezistence mezi nimi (Arbex et al. 2010).

Další mutace, které byly zkoumány v souvislosti s rezistencí k PZA je např. mutace v genu *rpsA* s cílovým místem ribozomálního proteinu 1. Recentní studie však této mutaci přisuzují spíše malou roli (Simons, 2013, Palomino et Martin 2014).

Velká diverzita v mutacích na *pncA* genu komplikuje vývoj molekulárních metod k detekci rezistence PZA.

4.2. Antituberkulotika a antibiotika druhé řady

AT a ATB druhé řady jsou podle WHO rozdělena do tří, resp. do čtyř skupin (viz tabulka č. 5). První skupinu tvoří fluorochinolony, druhou injektabilní AT a třetí AT s nižším účinkem. Do čtvrté skupiny jsou řazena AT, která nejsou pro léčbu rezistentní tuberkulózy klíčová (Tiberi et al., 2018). Makrolidy se k léčbě tuberkulózy nepoužívají, *M. tuberculosis* je k nim přirozeně rezistentní (Karakousis 2009). S výhodou a dobrým efektem se využívají pro léčbu mykobakterióz.

Tabulka 5 – WHO kategorizace antituberkulotik druhé řady doporučených pro léčbu rezistentní a multi-rezistentní TB (převzato z Tiberi et al. 2018)

Skupiny AT pro léčbu rezistentní TB				
Skupina A fluorochinolony	Skupina B injektabilním AT	Skupina C další klíčová AT	Skupina D další AT ne klíčová	
Levofloxacin	Amikacin	Ethionamide/prothionamide	Pyrazinamide	D ₁
Moxifloxacin	Kanamycin	Cycloserine/terizidone	Ethambutol	
Gatifloxacin	Kapreomycin	Linezolid	High-dose isoniazid	
		Clofazimin	Bedaquiline	D ₂
			Delamanid	
			Para-aminosalicylic acid	D ₃
			Imipenem plus cilastatin (requires clavulanate)	
			Meropenem (requires clavulanate)	
			Amoxicillin plus clavulanate	
			Thioacetazone*	

* u HIV negativních osob

4.2.1. Fluorochinolony

Tato ATB mají na *M. tuberculosis* výborný účinek. V současné skupina fluorochinolonů obsahuje několik preparátů s antimykobakteriálním účinkem: ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin a sparfloxacin. Z AT druhé řady jsou chinolony doporučovány pro léčbu MDR TB jako první. Jejich účinek spočívá především v zachycování gyrázy a topoizomerázy IV na DNA jako trojitého komplexu, čímž blokuje pohyb replikační vidličky a transkripci komplexů (Kolyva et Karakousis 2012, Karakousis 2009). *M. tuberculosis* na rozdíl od jiných bakterií topoizomerázu IV postrádá, ale obsahuje geny *gyrA* a *gyrB* kódující podjednotku DNA gyrázy A B (Karakousis 2009). S tím souvisí rezistence jako následek mutace na QRDR (viz dále).

Mechanismus rezistence

Rezistence *M. tuberculosis* je spojena s mutací na konzervovaném regionu QRDR (quinolone resistance-determining region) genů *gyrA* a *gyrB*. Tyto geny ovlivňují interakci mezi lékem a DNA gyrázou (Kolyva et Karakousis 2012). Stupeň rezistence je dán specifickou substitucí aminokyseliny na QRDR a také množstvím přítomných mutací. Samostatná mutace na *gyrA* může indukovat nízký stupeň rezistence (MIC >2 mg/l), více mutací na *gyrA* nebo současné mutace na *gyrA* a *gyrB* vedou k rezistenci vysokého stupně (Kolyva et Karakousis 2012). Nejčastěji detekovaná mutace je na pozici 90 (alanin) a 94 (kyselina asparagová). Kodon 95 obsahuje polymorfismus (serin nebo threonin), to ovšem s rezistencí nesouvisí, je to dáno přirozeně a vyskytuje se u citlivých i rezistentních kmenů.

Mutace v *gyrA* jsou u rezistentních kmenů přítomné cca v 42–85 % (Kolyva et Karakousis 2012). Lze tedy předpokládat, že existuje i jiný mechanismus rezistence. Obvykle se vyskytuje zkřížená rezistence ke všem fluorochinolonům. Přesto byly popsány izoláty s mutací v *gyrB* rezistentní k moxifloxacinu a gatifloxacinu a citlivé k ofloxacinu (Von Groll et al. 2009).

4.2.2. Injektabilní AT

Mezi injektabilním AT druhé řady patří preparáty ze skupiny aminoglykosidů – kanamycin a amikacin a dále cyklické polypeptidy kapreomycin a novější viomycin. Obě tyto skupiny působí na úrovni translace a obě ovlivňují funkci ledvin. Amikacin a kanamycin mají mezi sebou vysoký stupeň zkřížené rezistence, mezi ostatními je zkřížená rezistence variabilní. (Da Silva et Palomino 2011, Jnawali et Ryoo 2013).

Mechanismus rezistence

Rezistence u všech těchto AT je spojena se změnami na genu *rrs* na 16S rRNA, s mutací A1401G. Mutace se projevuje především na kmenech s vysokým stupněm rezistence k amikacinu a kanamycinu. Zkřížená rezistence k amikacinu a kanamycinu není absolutní, mutace na promotoru regionu genu *eis* (kóduje aminoglykosidovou acetyltransferázu) způsobuje nízkou úroveň rezistence u kanamycinu, ale nikoliv u amikacinu (Da Silva et Palomino 2011).

U kapreomycinu a viomycinu se dále uplatňuje mutace v genu *tlyA*, který kóduje rRNA methyltransferázu specifickou pro 2'-O-metylaci ribózy v rRNA (Da Silva et Palomino 2011). Tato mutace blokuje metylační aktivitu (Jnawali et Ryoo 2013).

4.2.3. Antituberkulotika s nižším účinkem

Mezi tato AT lze zařadit ethionamid, kyselinu p-amino salicylovou, cykloserin, clofazimin a některá další antibiotika jako např. linezolid, bedaquilin atd.

Ethionamid vyžaduje podobně jako INH aktivaci, zprostředkovanou mono-oxygenázou, která je kódována genem *ethA*. Mutace v *ethA* a *inhA* vede k rezistenci na tento lék. Rezistence může být vyvolána i mutací v genu *ndh*, který zvyšuje intracelulární koncentraci NADH. Jako další možná příčina rezistence se podle posledních studií jeví mutace v genu *mshA*, kódujícím glykosyltransferázu (Da Silva et Palomino 2011).

Kyselina p-amino salicylová (PAS) je jeden z nejstarších preparátů používaných k léčbě TB spolu se STM a INH. V moderní terapii se rutinně nepoužívá, ale v případě MDR TB se může využít jako rezervní preparát, když ostatní selhávají. Přesný mechanismus jejího účinku však dosud nebyl objasněn. Ve vzniku rezistence se uplatňují mutace v genu *thyA*, nejčastěji T202A, která může být současně považována za marker příslušnosti k linii LAM (viz dále) (Da Silva et Palomino 2011).

Linezolid se uplatňuje v léčbě rezistentní tuberkulózy relativně krátkou dobu. Inhibuje časnou fázi proteosyntézy navázáním na 50S ribozomální podjednotku. Rezistence je dosud popisována vzácně,

u rezistentních kmenů jde především o mutace G2061T a G2576T na genu 23S RNA (Da Silva et al. 2011).

Cykloserin inhibuje syntézu peptidoglykanu, cílová buněčná struktura u *M. tuberculosis* nebyla dosud popsána. Mechanismus rezistence je u tohoto preparátu komplexní, uplatňují se mutace v různých genech, např. *alr*, *ddl*, *cycA* (Chen et al. 2017).

Clofazimin je preparát vyvinutý primárně k léčbě tuberkulózy. Má poměrně široké spektrum účinku a působí synergicky při podání např. spolu s EMB, PZA nebo s amikacinem. Jeho aktivita je zaměřena především na pomalu se replikující mykobakteria. Primární rezistence není popisována, in vitro byly popsány mutace na genu *rvo678* s vlivem na *mmpS5-mmpL5*. U *Mycobacterium leprae*, na které je clofazimin vysoce účinný, lokus *rvo678-mmpS5-mmpL5* chybí, a proto u tohoto druhu není popsána žádná rezistence vůči clofaziminu (Cholo et al. 2017).

Bedaquilin je poměrně nový preparát patřící do skupiny diarylchinolonů. Působí na rychle se množící mykobakteria. Rezistence vůči bedaquilinu je spojena většinou se dvěma geny, a to s genem *atpE* a genem *rvo678*, jehož mutace se vyskytují častěji (Cholo et al. 2017).

Další z nejnovějších AT je delamanid, bicycklý nitroimidazooxazol. Jeho rezistence je dána mutacemi v genech *fgdI*, *fbiA*, *fbiB*, and *fbiC*, výjimečně v genu *ddn* (Fujiwara et al. 2018).

5. Epidemiologie tuberkulózy

Tuberkulóza je kapénkovou infekcí, je tedy přenášena infekčními kapénkami z nemocného s aktivní formou nemoci, nejčastěji plicní TB, dále může být přenesena i kontaktem s nemocnými zvířaty. Adaptace na hostitele souvisí s mírou virulence daného kmene, vysoká virulence může i usnadňovat přenos. Velmi vysoká virulence může vést ke smrtelnému průběhu nemoci nebo rozvoji závažných forem TB, jako je bazilární meningitida nebo miliární TB (Mostowy et Behr 2005).

Epidemiologická situace ve výskytu tuberkulózy se významně liší podle geografických území v přímé závislosti na ekonomické vyspělosti daných oblastí.

5.1. Epidemiologie ve světě

I v současné době vévodí TB v celosvětovém měřítku žebříčku deseti nejčastějších příčin úmrtí. Statistiky WHO uvádějí, že v roce 2017 onemocnělo aktivní formou TB asi 10 milionů lidí (z toho 1 milion dětí) a 1,6 milionu nemocných zemřelo (z toho 0,3 milionu HIV pozitivních a 230 000 dětí) (WHO 2018). V posledních několika letech sice incidence TB celosvětově klesá, ale zatím jen velmi mírně (zhruba o 2 % za rok). Mnohem více lidí (uvádí se, že až jedna čtvrtina populace) nese ve svém organismu bacil TB, tedy *M. tuberculosis*, v latentní formě. Více než 95 % všech případů TB se vyskytuje v rozvojových zemích. Nejvyšší incidence je v zemích jihovýchodní Asie a Afriky. Dvě třetiny nemocných s aktivní TB se vyskytují v 8 zemích: Indii, Číně, Indonésii, Filipínách, Pákistánu, Nigérii, Bangladéši a v Jižní Africe. U HIV pozitivních osob je riziko nákazy TB 20 až 30x vyšší než u HIV negativních (WHO 2018). Podle vyhlášky č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů, uveřejňuje Ministerstvo zdravotnictví aktuálně seznam států s vyšším výskytem tuberkulózy podle údajů Světové zdravotnické organizace. Z aktualizace z ledna 2019 je situace následující (MZ ČR 2019):

Státy s vyšším výskytem TBC

V Evropě: Litva, Moldávie, Rumunsko, Rusko a Ukrajina.

V Asii: všechny asijské státy kromě Bahrajnu, Íránu, Izraele, Japonska, Jordánska, Kataru, Kuvajtu, Libanonu, Maledív, Ománu, Saudské Arábie, Spojených arabských emirátů, Sýrie a Turecka.

V Africe: všechny africké státy kromě Egypta, Komor, Libye, Mauricia, Seychel a Tuniska.

V Americe: Bolívie, Brazílie, Dominikánská republika, Ekvádor, Guyana, Haiti, Nikaragua, Panama, Paraguay, Peru, Salvador a Venezuela.

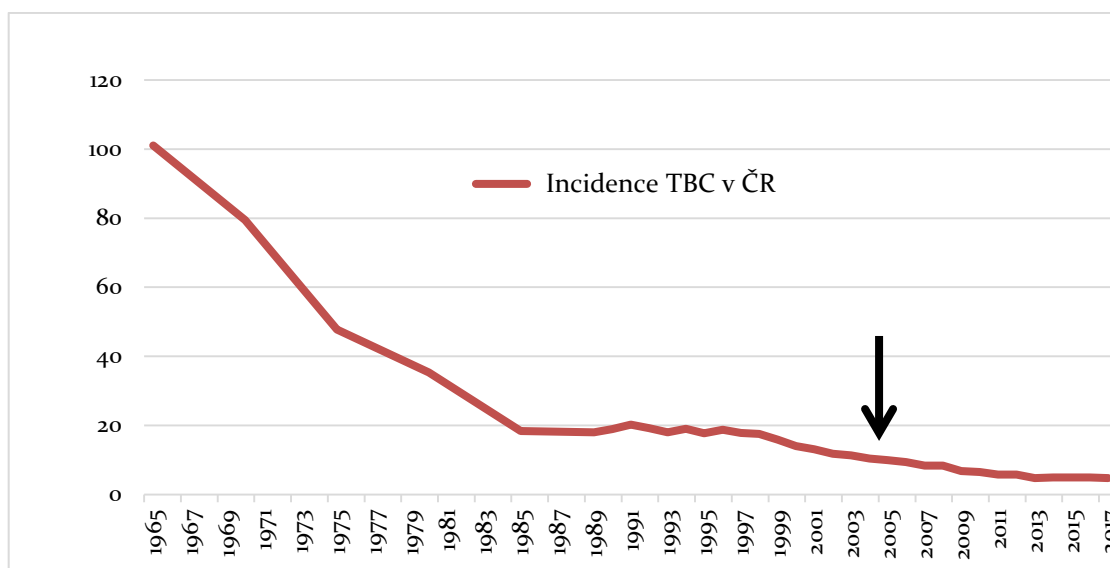
V Austrálii a Oceánii: Fidži, Kiribati, Marshallovy ostrovy, Mikronésie, Nauru, Palau, Papua-Nová Guinea, Šalamounovy ostrovy, Tuvalu a Vanuatu.

5.2. Epidemiologie TB v České republice

V České republice je u TB epidemiologická intervence dlouhodobě na vysoké úrovni. Kontrola TB je velmi účinná, její mechanismy a možnosti jsou plně podporované státem a zabezpečeny legislativou

(povinné hlášení, povinná léčba, dispenzarizace pacientů). Toto vede spolu s vysokou životní úrovní k postupnému snižování incidence TB v ČR, v posledních letech až pod 5 nových případů na 100 000 obyvatel za rok, viz obrázek 7. Česká republika je tak řazena mezi země s nízkým výskytem TB (kritérium incidence menší než 10/100 000) a i mezi těmito zeměmi má jednu z nejnižších incidencí. Vzhledem k povaze onemocnění a přítomnosti cizinců ze zemí s vysokým výskytem TB již nelze předpokládat další významné snížení už tak minimální incidence. Data jsou soustředěna v Národní jednotce dohledu nad TB, zřízené z rozhodnutí Ministerstva zdravotnictví v roce 1994 za podpory WHO. Jednotka provádí analýzu epidemiologické situace TB v České republice a vyhodnocuje účinnost antituberkulotické léčby.

Všechny případy otevřené tuberkulózy (viz výše) jsou povinně hlášeny do registru tuberkulózy (RT) a do jeho laboratorní složky ISBT (Informační systém bacilární TB) bez ohledu na to, zda je zahájena léčba, nebo nikoliv (např. u zemřelých osob).



Pozn.: šipka označuje rok poklesu incidence TB pod 10 nových případů/100 000 obyvatel

Obrázek 7 – Vývoj incidence v České republice, resp. v ČSSR a ČSR, (zdroj: zpracováno podle údajů ÚZIS ČR)

5.3. Možnosti prevence TB a epidemiologická opatření

V prevenci onemocnění tuberkulózou existují určité možnosti. Proto, aby byly co nejúčinnější, je nezbytná koordinace postupů na státní úrovni, ve světovém měřítku pak i na mezinárodní úrovni. Řešení situace z hlediska výskytu tuberkulózy koordinuje WHO, včetně pracovních skupin v rámci WHO StopTBP Partnership, dále se podílejí např. ECDC, CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

Nejdůležitějším momentem je zabránění přenosu infekce z nemocného člověka dále. Toho lze dosáhnout rychlou a přesnou diagnostikou, správnou léčbou a izolací epidemiologicky rizikové osoby. Ve vyspělých zemích je toto zajištěno právní cestou. Například v České republice patří TB

mezi povinně hlášená a povinně léčená onemocnění s povinností pacienta podrobit se po dobu infekčnosti izolaci. Problémem se i tato základní opatření mohou stát v zemích s nízkou ekonomickou úrovní. V rozvojových zemích a současně tedy v zemích s vysokým výskytem TB a obtížně dostupnou diagnostikou a léčbou se klade důraz i na edukaci obyvatel. Doporučení pro běžné obyvatelstvo je formulováno ve smyslu důkladného větrání obydlí, poučení, aby osoby s kašlem dodržovali etický a hygienický režim, aby mikroskopicky pozitivní pacient trávil co nejvíce času mimo obydlí (venku), aby nemocní spali odděleně, nejezdili veřejnou dopravou a nezdržovali se na místech s jinými lidmi. K dalším možnostem prevence bovinní TB v rozvojových zemích patří i doporučení pasterizace mléka.

Obecně uznávanou, ale bohužel jen částečně úspěšnou prevencí je očkování. O očkovací látce bylo pojednáno výše. Očkování proti tuberkulóze nechrání proti onemocnění jako takovému, ale pouze proti vzniku klinicky závažných forem, miliární TB a bazilární meningitidy. Účinnost vakcíny je nejvyšší v dětství, věkem klesá a vakcinace dospělých osob nemá praktický význam. Přenosu TB mezi dospělými vakcinace nezabrání.

WHO po 2. světové válce zorganizovala v souvislosti se závažnými důsledky války na obyvatelstvo celosvětovou vakcinační kampaň, kdy bylo tuberkulinovým testem vyšetřeno téměř 30 milionů lidí a z toho 14 milionů naočkováno.

V ČR se začalo očkovat v roce 1948 pod hlavičkou UNICEF (očkování tuberkulin negativních dětí a mladistvých ve věku 1–18 let. V roce 1953 byla zavedena plošná vakcinace novorozenců (Svobodová, 2018). V 11 letech pak probíhala revakcinace u tuberkulin negativních dětí. 1. 11. 2010 došlo v ČR k zásadní změně v očkování proti TB, od té doby se očkují pouze novorozenci z rizikových skupin, které specifikuje vyhláška č. 299/2010 Sb. Očkování ostatních novorozenců a dětí může být provedeno na žádost rodičů za poplatek. Vakcinuje se výhradně vakcínou BCG (živá oslabená). V místě vakcinace proběhne lokální zánět, alergická reakce IV. typu. Celoplošná vakcinace byla v ČR zrušena na základě několika skutečností, kdy riziko vzniku TB bylo vyhodnoceno jako menší, než riziko komplikací vlastního očkování a riziko odsunutí ostatní povinné vakcinace z důvodu nezhojení ložiska po vakcinaci BCG. Jedná se zejména o nízkou incidenci TB v ČR a stoupající výskyt komplikací po vakcinaci BCG.

Je známo, že vakcinace BCG chrání také děti nižších věkových skupin proti vzniku lymfadenitidy způsobené *Mycobacterium avium*. Po zrušení vakcinace se projevil mírný nárůst tohoto onemocnění u dětí.

6. Laboratorní diagnostika tuberkulózy

6.1. Mikroskopický průkaz

Mikroskopický průkaz acidorezistentních tyčinek ve vzorku klinického materiálu patří spolu s kultivací do zlatého standardu mykobakteriologického vyšetření. Jde o rychlé vyšetření, i když s relativně nízkou senzitivitou. Pacient s mikroskopicky prokázanou pozitivitou představuje významné epidemiologické riziko.

Pro mikroskopický průkaz se využívá barvení fluorescenční, nejčastěji jako screeningové, a pak barvení dle Ziehl-Neelsena, jednak jako ověřovací a také jako technika, kde lze hodnotit i morfologii ART.

6.2. Kultivace

Podle standardních postupů by mělo být kultivační vyšetření provedeno z každého vyšetřovaného vzorku. Pouze pozitivní kultivace přináší kompletní potvrzení přítomnosti tuberkulózní infekce a pouze z izolovaného kmene lze určit přesnou identifikaci, stanovit citlivost a případně určit epidemiologické charakteristiky.

Kultivační metody lze rozdělit na klasické a tzv. metabolické. Klasické metody znamenají kultivaci na vaječných pevných médiích (Löwenstein-Jensenova a Ogawova půda), event. v tekutých půdách, např. půda Šulova). Tento způsob kultivace je časově náročnější (kultivace v trvání až týdnů) a méně citlivý. Do standardních postupů je zařazen proto, že existují kmeny *M. tuberculosis*, které v tekutých půdách nerostou. Kombinace kultivačních postupů tak zvyšuje senzitivitu celkového laboratorního průkazu. Metabolické metody využívají automatickou detekci metabolických produktů mykobakterií, které vznikají při pozitivě vzorku v tekutém kultivačním médiu (podle výrobce nejčastěji různé modifikace Middlebrookova média). Tyto postupy jsou senzitivnější a rychlejší, než kultivace klasická (standardní délka kultivace 6 týdnů), ekonomicky jsou ovšem náročnější. Pro plnohodnotné mykobakteriologické vyšetření je nutné zařadit oba postupy.

6.3. Identifikace druhů

Identifikace mykobakteriálních druhů se provádí různými způsoby. Nejstarší ale také nejméně přesná je identifikace tzv. klasická na základě metabolické aktivity druhu. Využívá se zde řada charakteristik (pigmentace, charakter kolonií, růst v různých teplotách), dále pak řady biochemických testů. Mezi moderní metody patří hmotnostní spektrometrie (viz příloha č. 1 a příloha č. 2) a dále identifikace molekulárně-genetickými metodami. K odlišení *M. tuberculosis* komplex od ostatních druhů se využívá detekce MPT64 (viz výše).

6.4. Stanovení citlivosti

Ke stanovení citlivosti mykobakterií se využívají diluční metody a metody testování růstu kmene na půdě s AT a ATB v porovnání s kontrolou bez léčiva. U *M. tuberculosis* komplexu je možné stanovit citlivost metodou proporční (dle Canettiho) na vaječných půdách obsahujících kritickou koncentraci

příslušného antituberkulotika, dále metodou v automatickém metabolickém systému a také diluční metodou stanovení MIC v mikrotitrační destičce.

Breakpointy jsou stanoveny pro každou metodu zvlášť pouze pro *M. tuberculosis* komplex a pouze pro základní AT a vybraná AT druhé řady.

Detekce mutací genů odpovědných za rezistenci musí být vždy doprovázena stanovením citlivosti *in vitro* a interpretace výsledků musí vycházet ze zjištěných faktů z obou metod.

6.5. Diagnostika latentní tuberkulózy

Prokázat latentní formu TB, tedy proces, kdy jsou v plicích přítomny bakterie TB, ale infekční proces je pod kontrolou makroorganismu a není aktivní, je velice obtížné. V obraně proti TB se protilátky uplatňují minimálně. Podle doporučených postupů se testování protilátkové odpovědi nedoporučuje, zejména kvůli obtížné interpretaci a možnosti nesprávných závěrů (WHO 2011). Specifickou informaci o přítomnosti tuberkulózních bacilů v organismu poskytují testy detekující buněčnou složku imunity. Historicky starší, levnější, ale méně senzitivní tuberkulinový kožní test a novější přesnější metody IGRA (viz příloha č. 3). Přesto je nepřímá diagnostika tuberkulózy pouze doplňkovou metodou při stanovení diagnózy TB, její výsledky je nutné hodnotit vždy v souvislostech se stavem nemocného a výsledky dalších testů. Jedinou možnou metodou průkazu zůstává ale u latentní formy TB. Proto se využívá zejména jako screeningové vyšetření u pacientů před zahájením biologické léčby blokátorem TNF alfa a některými dalšími preparáty ovlivňujícími buněčnou imunitu.

7. Molekulárně genetické metody k detekci a analýze *Mycobacterium tuberculosis*

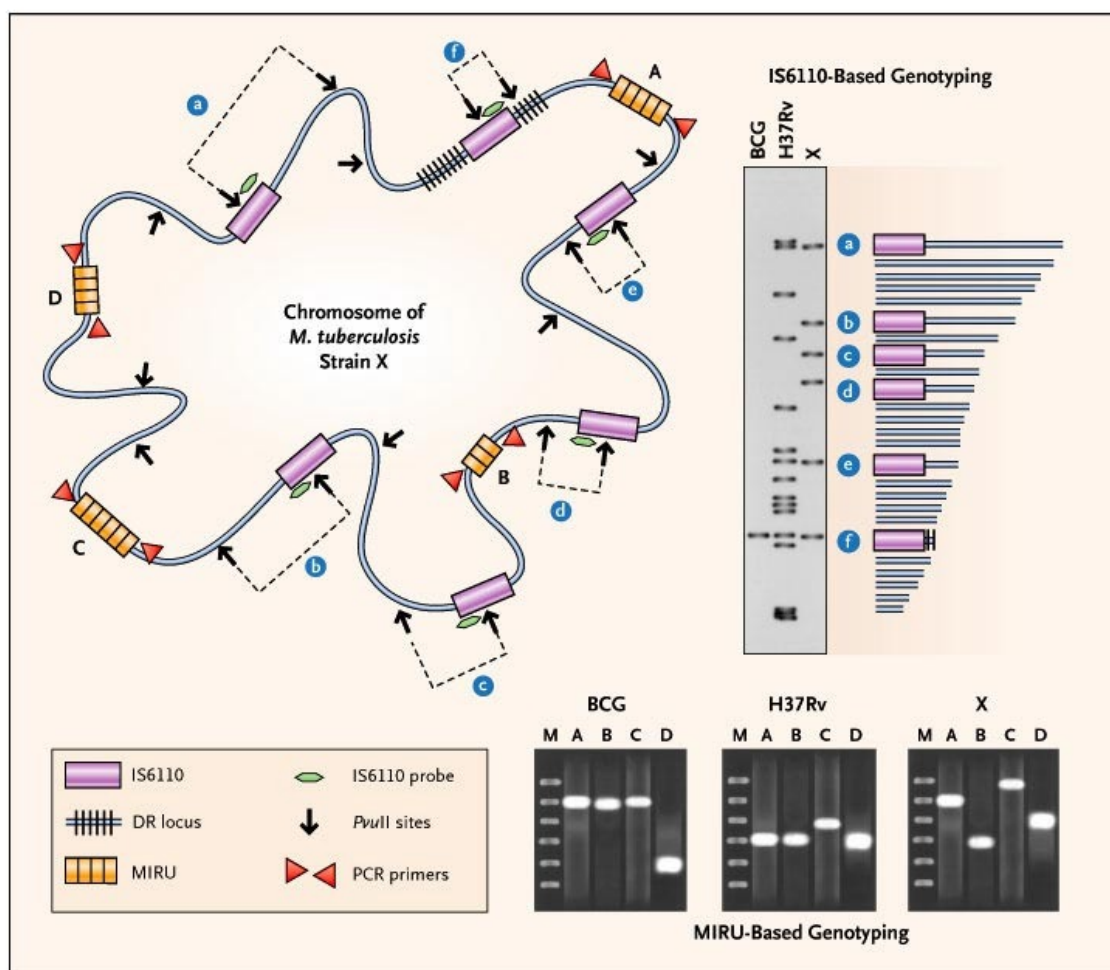
Molekulárně genetické metody tvoří spolu s metodami epidemiologickými postupy tzv. molekulární epidemiologie, která zkoumá šíření nemocí na molekulární úrovni. To je přínosné u infekčních nemocí, kdy je nutné rozlišit situace primární infekce, reaktivace stejným kmene u již dříve proběhlého procesu, anebo v případě TB i aktivace latentní formy onemocnění. Molekulární epidemiologie odhaluje také globální způsoby šíření TB, přispívá k poznání rizikových faktorů spojených s výskytem TB, pomáhá při výzkumu patogeneze onemocnění a v neposlední řadě může pomoci i při odhalení zkřížené kontaminace v laboratořích.

7.1. Genotypizace kmenů *M. tuberculosis*

Rutinní identifikace izolátů do úrovně druhu na základě fenotypových a biochemických vlastností je do jisté míry subjektivním a dlouhotrvajícím procesem. V posledních letech byly vyvinuty molekulární metody, které umožňují přesnější identifikaci izolátů a také odlišení jednotlivých genotypů v rámci druhu a případně i detekci mutací vedoucích k rezistenci k antituberkulotikům a antibiotikům. Přestože je druh *M. tuberculosis* geneticky monomorfní a diverzita druhů je velice malá, existují genetické rozdíly, které umožňují rozlišení různých genotypů v závislosti např. na geografickém výskytu.

Mapování genomu bakterií obecně, včetně u *M. tuberculosis*, se zabývá jednak detekcí polymorfismů v jednotlivých nukleotidech a jednak detekcí polymorfismu v inzercích resp. v delecích (tzv. regions of difference RD) v genomu (Nahid et al. 2010).

Starší molekulárně-epidemiologické metody jsou obecně založeny na detekci specifických úseků genomu amplifikací pomocí PCR, která je následována gelovou elektroforézou. Tento proces bývá někdy nazýván "fingerprinting" (otisky DNA). Genetické markery používané v těchto metodách jsou definovány jako: variabilní počty a lokace inzerčních sekvencí IS6110 resp. tzv. PGRS regionů detekovaných jako DNA fragmenty vymezené těmito markery o různé molekulové hmotnosti (RFLP), dále polymorfismem v tzv. direct repeat lokusech, které patří do skupiny CRISPR (detekce spolypolymorfismem), dále polymorfismem MIRU lokusů, mutace pro rezistenci k AT a ATB, polymorfismem velkých fragmentů (large sequences), resp. jejich přítomností nebo nepřítomností, specifickými sekvencemi tzv. násobných lokusů a celogenomovou sekvenací (Kato-Madea et al. 2011, Kanduma et al. 2003). Schématické znázornění viz obrázek č. 8.



Obrázek 8 – Hypotetický genom *M. tuberculosis* a vyznačené repetitivní sekvence využitelné pro jednotlivé genotypizační metody (převzato z Barnes et Cave 2003)

V následujícím přehledu (podle Kato-Maeda et al. 2011 a Orduz et Ribón 2015) jsou představeny jednotlivé metody umožňující genotypizaci *M. tuberculosis*. Princip a porovnání genotypizačních metod uvádí příloha č. 4.

7.1.1. IS6110 – RFLP

Inzerční sekvence (IS) – inzerční elementy – jsou segmenty DNA s invertovanými repeticemi na svých koncích. Jejich celková velikost se pohybuje o délce 700–2500 bp (Thierry et al. 1990).

IS6110 se vyskytují pouze v genomu komplexu *M. tuberculosis* (Coros et al. 2008, Thierry et al. 1990a). Tyto sekvence obsahují 1361 párů bází (bp) (Thierry et al. 1990a, Sankar et al. 2011) a patří ke skupině tzv. mobilních elementů IS3. *M. tuberculosis* má 0–25 kopií IS6110, většinou obsahuje 8–15 kopií, např. referenční kmen *M. tuberculosis* H37Rv má 16 kopií této inzerční sekvence (Zheng et al. 2008). Cílové umístění těchto sekvencí není dosud přesně známo, ale předpokládá se, že není náhodné (Kato-Maeda et al. 2011). Některé pravděpodobné lokace těchto sekvencí byly popsány v posledních letech (Kim et al. 2010). U různých druhů komplexu *M. tuberculosis* se IS6110 vyskytují specificky pro

daný klastř v různém počtu kopií a na různých místech genomu, což je právě velice výhodné jednak pro detekci těchto druhů a také pro epidemiologické studie (Coros et al. 2008, Thierry et al. 1990b, van Embden et al. 1993).

Základním principem genotypizační metody využívající IS6110 je tedy variabilita počtu těchto inzerčních sekvencí a velikost DNA restričních fragmentů, které tyto IS obsahují (Desikan et Narayanan 2015). Toto označuje i název metody – Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Prvním krokem metody je izolace a vyčištění DNA z izolátů *M. tuberculosis*. Poté je k DNA přidán restriční enzym PvuII, který rozštěpí DNA na stovky různých fragmentů ve specifických sekvencích, přičemž některé z těchto fragmentů obsahují IS6110. Fragменты DNA jsou rozděleny podle molekulové hmotnosti na agarózovém gelu a přeneseny na membránu. Poté jsou hybridizací detekovány fragmenty, které obsahují IS6110, a to sondou (probou) navázanou na vazebné místo IS6110. Každá kopie IS6110 vytvoří jeden proužek. Genotyp *M. tuberculosis* je pak určen v závislosti na počtu proužků.

Tato metoda byla do nedávna považována za zlatý standard molekulární epidemiologie *M. tuberculosis*. Byla široce používána na začátku 90. let 20. století. Má poměrně dobrou rozlišovací schopnost (Kato-Maeda et al. 2011), reprodukovatelnost a relativně nízké náklady, proto byla vhodná zejména pro srovnávací studie (van Embden et al. 1993, Mokrousov et al. 2013). Omezením této metody je fakt, že u kmenů s nižším počtem IS6110 než 6 je rozlišovací schopnost nedostatečná a je pak nutné využít jiné typy metod. Nevýhodou této metody je také nutnost poměrně velkého množství kvalitní DNA (2–3 µg) (Desikan et Narayanan 2015), dále náročný laboratorní postup, drahý počítačový software a především stabilita vkládací sekvence – profil stejného vzorku se může časem změnit (Ei et al. 2016). Z těchto důvodů byla tato metoda nahrazena novějšími metodami, např. MIRU-VNTR (Mokrousov et al. 2013).

Pro genotypizaci je možné využít také IS1081, ale ta má mnohem menší polymorfismus. Pro rutinní genotypizaci používána není (Orduz et Ribón 2015).

7.1.2. PGRS-RFLP

Markery PGRS jsou používány v případech, kdy mají izoláty 5 a méně IS6110. Mohou zvýšit rozlišovací schopnost metody (Rhee 2000). PGRS (Polymorphic GC-rich repetitive sequence) se vyskytují v mnoha skupinách kopií na několika místech chromozómu *M. tuberculosis*. Obsah GC bází je relativně stálý. Evoluční změny v tomto markeru jsou pomalejší než u IS6110. Vizualizace těchto sekvencí je také na principu RFLP metody (Kato-Maeda et al. 2011, Rhee 2000). V poslední době se tato metoda příliš nevyužívá, je nahrazena modernějšími metodami (Desikan et Narayanan 2015).

7.1.3. Spoligotyping

Spoligotyping využívá polymorfismus DNA, který je prezentován v přesně se opakujících úsecích sekvencí menší velikosti a variabilních distančních úseků. Tyto úseky se nazývají direct repeat region (DR – konzervativní přímá repetice). Celý variabilní direct repeat region (DVR) se skládá

z konzervativního DR lokusu a nonrepetitivní sekvence nazývané spacer (mezerník neboli meziprostor). Každý DR má 36 bp a tyto celistvé DR jsou rozprostřeny v jedinečných úsecích nekódující spacerové DNA (spacer DNA), které mají různou jak sekvenci, tak délku (35–41 bp) (Desikan et Narayanan 2015). DR patří do skupiny CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) (Zhang et al. 2010). Celkem existuje 94 spacerů, ale pouze 43 je používáno v běžných genotypizačních metodách. 37 z nich je typických pro *M. tuberculosis*, dalších 6 navíc charakterizuje *M. bovis* BCG (Desikan et Narayanan 2015). Přítomnost nebo chybění těchto spacerových DNA sekvencí a variabilita v DR jsou typické pro jednotlivé genotypy. Původ názvu metody spoligotyping je z “spacer oligonucleotide typing” (Brudey et al. 2006).

Spacery jsou amplifikovány PCR reakcí. Existují dvě metody vedoucí k získání spoligotypů. První je založena na reverzní hybridizaci, kdy je produkt PCR hybridizován na membráně, a druhá pak na luminexové technologii. V tomto případě je spacer kovalentně navázán na mikrokuličky, které slouží jako vychytávací sonda, která obsahuje fluorochromy (Kato-Maeda et al. 2011).

Protože je DNA amplifikována, je pro typizaci spoligotypingem zapotřebí velmi málo DNA (20–50 ng). Tato metoda lze také provádět přímo ze vzorku klinického materiálu (Kamerbeek et al. 1997, Kato-Maeda et al. 2011, Ei et al. 2016). Výsledné zpracování dat se provádí převedením na binární nebo oktální numerický systém, což umožňuje zpracování globálních databází a komparativních studií. Limitací metody je nižší rozlišovací schopnost v porovnání s IS6110-RFLP a MIRU-VNTR, což je dáno tím, že spoligotyping pracuje pouze s 0,1 % genomu (RFLP pak s genomem kompletním) (Kamerbeek et al. 1997, Mokrousov et al. 2013).

7.1.4. MIRU-VNTR

MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) jsou lokusy DNA v genomu *M. tuberculosis* o délce 40–100 bp, které se řadí k mikrosatelitům (Supply et al. 2001; Sun et al. 2016). Nacházejí se rozptýleně v genomu jako tandemové repetice, tedy opakující se jednotky identické nebo podobné sekvence DNA, které jsou na chromosomu lokalizovány v řadě za sebou. Jejich délka je 52–77 nukleotidů (Desikan et Narayanan 2015). *M. tuberculosis* H37Rv obsahuje 41 MIRU lokusů, ale pro rutinní genotyping je využíváno pouze 12 resp. 24 z nich (Ei et al. 2016; Sun et al. 2016). 24 lokusů je doporučováno zejména pro typizaci izolátů genotypu Beijing (Desikan et Narayanan 2015). Množství kopií těchto repetitivních sekvencí je u různých genotypů různé, proto Variable Number Tandem Repeats (VNTR).

Tato metoda porovnává množství polymorfismů a velikost repetitivní DNA sekvencí na každém z lokusů pomocí PCR a elektroforézy (Ramos et al. 2014). Amplifikace PCR využívá primery specifické pro okrajové části regionů VNTR. Amplifikován je tak každý lokus a produkt amplifikace je vizualizován na gelu. Délka repetitivní jednotky je známá, a tak množství PCR produktu odráží počet kopií v repetitivní jednotce. Tento počet je pak převeden do numerického kódu. PCR může být prováděno

jako multiplexní, kdy je jeden z primerů z každé dvojice označen rozdílnou fluorescenční barvou. Amplikony mohou být detekovány automatickým sekvenátorem.

Rozlišovací schopnost a reproducibilita této metody je poměrně vysoká, závisí na počtu analyzovaných lokusů. V posledních letech je MIRU-VNTR považována za nový zlatý standard pro genotypizaci *M. tuberculosis* (Kato-Maeda et al. 2011). K provedení metody je potřeba malé množství mykobakteriální DNA a tato DNA nemusí být purifikována (Desikan et Narayanan 2015). Některé PCR produkty mohou být u specifických vzorků negativní v některých lokusech, to může být důsledkem delece regionu nebo vysokým počtem opakujících se jednotek. Ve specifických případech je možné nalézt dvojité alely na stejném místě. To je pak považováno za klonální variantu stejného kmene. Pokud dvojité alely překročí dva lokusy, pak se infekce považuje za smíšenou (Ei et al. 2016, Sun et al. 2016).

7.1.5. Další metody založené na PCR

Rep-PCR (repetitive element sequence based-polymerase chain reaction) je založena na PCR amplifikaci genomových oblastí mezi opakujícími se elementů, které jsou rozmístěny v celém genomu (Farber 1996, Jagielski et al. 2014). Amplikony DNA jsou pak detekovány elektroforézou. Genetická příbuznost je odvozena z porovnání struktury pásu vytvořeného gelovou elektroforézou, z počtu opakujících se prvků a z polohy těchto prvků v genomu. Diskriminační síla je vysoká, metodu lze použít pro izoláty, které nemohou typizovány RFLP (malý počet kopií) nebo MIRU-VNTR (např. genotyp Beijing). V tomto případě se používají jiné opakující se prvky než IS6110.

Jiné typy metod se používají velmi zřídka vzhledem k jejich nízké diferenční schopnosti nebo obtížné implementaci.

7.1.6. Mutace spojené s rezistencí

Detekce mutací souvisejících s rezistencí jsou pro účely genotypizace prováděny většinou společně s vyhledáváním dalších genetických markerů. Zásadní a hlavní detekované mutace pro rezistenci k antituberkulotikům jsou detekce *rpoB* (indukce rezistence k rifampicinu) a *katG* a *inhA* (rezistence k isoniazidu).

7.1.7. Metody pro fylogenetickou analýzu

Tyto metody se využívají zejména pro klasifikaci izolátů *M. tuberculosis* do čeledi a fylogenetických linií. Je prokázáno, že různé vývojové linie *M. tuberculosis* mohou mít různé fenotypové charakteristiky včetně různých vlastností v přenosu a patogenitě (Kato-Maeda et al. 2011).

Analýza jednonuklidového polymorfismu – single nucleotid polymorphism SNP sleduje odchylky jednotlivých nukleotidů DNA. Typy SNP se mohou rozdělit do dvou skupin. Jednak shodné (synonymous), tedy ty, kdy změna nukleotidu nevede ke změně výsledné aminokyseliny, a pak neshodné (nonsynonymous), kdy je výsledná aminokyselina jiná než původní, a tato změna se projeví i fenotypově, například vznikem rezistence k antituberkulotiku (Desikan et Narayanan 2015).

Metoda Large Sequence Polymorphism definuje geografické struktury, podle nichž se jmenují jednotlivé linie *M. tuberculosis* (euroamerická, východoasijská, indooceánská, východoafrickoindická a západoafrická s liniemi 1 a 2 – známá jako *M. africanum*) (Gagneux et al. 2006a). LSP je založena na detekci delecí v genomu, které jsou oproti transpozici inzerčních sekvencí ireverzibilní. K detekci delecí využívají tyto metody zejména mikroarray (DNA čipy), kdy je testovaný izolát porovnáván s referenčním kmenem (Desikan et Narayanan 2015). Mezi LSP patří analýza regionů RD (regions of difference). Některé chromozomální delece jsou spojené s transpozicí IS. Delece objevující se v těchto regionech se nazývají RD. Existují dva typy delecí – staré a nové. Staré se objevují v různých úrovních vývoje druhů a jsou poměrně rozšířené. Mladé delece mají omezené rozšíření (Desikan et Narayanan 2015). Např. IS6110 související s lokusem RvD2 u *M. tuberculosis* H37Rv je přítomna u blízkého odvozeného avirulentního kmene H37Ra (Brosch et al. 1999). V klinických izolátech *M. tuberculosis* jsou RD typické svojí variabilitou. Jsou zkoumány různé druhy těchto lokusů, např. RD9, RD105 atd. (Flores 2007, Desikan et Narayanan 2015). Dalším markerem detekovaným metodou LSP je např. delece specifického fragmentu TbD1 o velikosti 2153 bp (Flores 2007, Desikan et Narayanan 2015).

Další z metod – multilokusová sekvenační typizace je založena na analýze sekvence DNA mnohočetných genů – mnohočetných lokusů u *M. tuberculosis* (Kato-Maeda et al. 2011).

7.1.8. Celogenomová sekvenace

Sekvenování celého genomu mikroorganismů bylo prováděno i staršími sekvenačními technikami (Sangerova metoda apod.). Ovšem pracnost a ekonomické náklady neumožňovaly sekvenování celých genomů rutinně.

Dnes patří celogenomové sekvenace (Whole Genome Sequencing [WGS]) mezi nejmodernější molekulárně-genetické metody vyvinuté v posledních dvaceti letech. Bývají označovány jako sekvenace nové generace (New Generation Sequencing [NGS]) a umožňují sekvenaci vysokého počtu izolátů najednou. Proces sekvenace všech izolátů je paralelní (Massive Parallel Sequencing [MPS]), přičemž jeho výsledkem je obrovské množství výstupních dat. Další analýzy získaných dat jsou proto nezbytné.

Pro NGS existuje několik různých technologií – platforem, jejichž výběr závisí na účelu použití (Ansorge, 2016). Každá z technologií má svoje výhody a nevýhody. Obecné schéma všech NGS technologií lze charakterizovat jako sled kroků: fragmentace templátové DNA na úseky dlouhé několik set bází až kilobází, zatupení získaných fragmentů enzymatickou reakcí a jejich napojení k oligonukleotidům určité sekvence (adaptérům), amplifikace jednotlivých úseků PCR reakcí (některé technologie tento krok neobsahují), paralelní sekvenace všech ampliconů (v jednom kroku). Získané sekvence (tzv. „čtení“ – „reads“) jsou dlouhé 20–700 bp. Výtěžek sekvenačního procesu může být až několik tisíc Gb, a proto je k vyhodnocení a analýze dat nezbytný specializovaný software a výpočetní technika s výkonným hardware, což může tuto metodu limitovat v rutinním použití. Cena

za sekvenování je nižší než u starší kapilární Sangerovy metody. NGS se využívá jednak k celogenomové sekvenaci *de novo* (sekvenování neznámých genomů) nebo například v mikrobiologii k analýze biologické diverzity (metagenomika), dále pak k sekvenování plazmidů, chromozómů nebo mitochondrií, k analýze exprese kódující i nekódující DNA atd. Nejčastěji používané platformy NGS jsou 454 (Roche), MiSeq/HiSeq/NovaSeq (Illumina), SOLiD (Applied Biosystem), Ion Torrent (Life Technologies), RSII/Sequel (Pacific Bioscience), MinION (Oxford Nanopore), Genia (Roche), Irys system (BioNano genomics) (Ansorge 2016).

Výsledná data jsou převedena do různých formátů pomocí FTP server (File Transfer Protocol). Nejužívanější software pro WGS jsou FASTQ, SAM/BAM, VCF a SFF (Satta et al. 2017). Nejběžnější je FASTQ vyvinutý ve Wellcome Trust Sanger Institute. Shrnuje data ze softwaru FASTA (fast alignment), který umožňuje srovnávání sekvencí DNA a proteinů. Zároveň data srovnává kvantitativně. Je recentním standardním prostředkem ke shromáždění a uložení dat získaných ze sekvenačních zařízení typu Illumina Genome Analyzer (Cock et al. 2010).

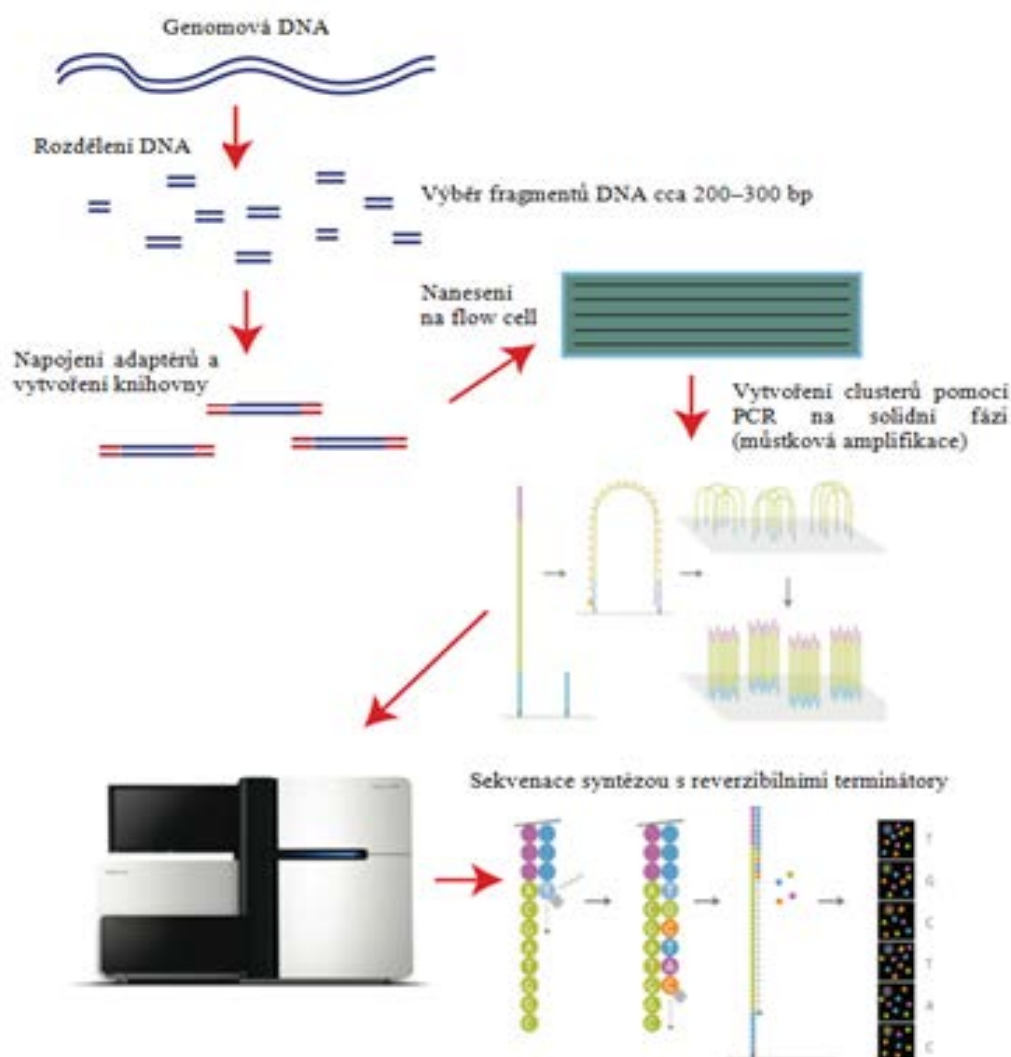
V současné době existuje mnoho softwarových nástrojů k analýze WGS. Pro rutinní praxi jsou ovšem vhodné jen ty, které jsou dostupné on-line zdarma v angličtině a které jsou schopny analyzovat přímo surové soubory dat FASTQ (Satta et al. 2017). Podle Satta et al. (2017) mezi ně patří např. Mykrobe predictor (vyvinut Wellcome Trust Center for Human Genetics and collaborators), TB profile (London School of Hygiene and Tropical Medicine), TGS-TB – Total Genotyping Solution for *M. tuberculosis* (vytvořen Sekizukou et al. 2015) a PhyRes SE – Phylo-Resistance Search Engine (Feuerriegel et al. 2015).

Výsledkem WGS je informace o celém genomu. Při vlastní genotypizaci a porovnávání kmenů lze pak využít různých markerů podle typu hledaných souvislostí. U *M. tuberculosis* se lze zaměřit např. na IS 6110 RFLP, VNTR nebo SNP. Referenčním postupem je ustanovena analýza SNP, tedy rozdíl v jednotlivých bázích genomu v porovnání s referenčním kmenem, a inserce nebo delece vyskytující se v izolátu opět v porovnání s referenčním kmenem (Robyn et al. 2015). Podobně nalezené změny nukleotidů (mutace) predikují rezistenci vůči AT a ATB.

Do zavedení WGS byly analýzy genomu *M. tuberculosis* omezeny kvůli přítomnosti vysoce diverzifikovaných tzv. PE (proline-glutamate) a PPE (proline-proline-glutamate) genových skupin, které obsahují velké množství guaninu a cytosinu a velmi často se opakují, mohou tvořit až 10 % kódující sekvence *M. tuberculosis* (Cole et al. 1998). To komplikuje sekvenování a sestavení genomu, protože vzhledem k mnoha opakováním nemusí být jednoznačně určeno správné zařazení příslušného čtení (reads) na správnou pozici do genomu. Proto jsou u analýz tyto úseky vyloučeny z hodnocení (Robyn et al. 2015). Přesná funkce PE a PPE není přesně známa, ale pravděpodobně mají vliv na reakci lidského imunitního systému (Bryant et al. 2013b). I u WGS je k analýze těchto úseků nutné zvolit vhodný postup, protože jejich mapování je velmi náchylné k chybám.

Stejně tak i WGS *M. tuberculosis* začíná extrakcí a purifikací DNA. Následně je tato DNA fragmentována na krátké úseky (100–500 bp), jejich konce jsou upravené (blunt ended) a napojené na adaptéry. Následuje amplifikace a sekvenace. Pro genotypizaci *M. tuberculosis* jsou využívány postupy vytvářející krátká čtení, např. Illumina MiSeq (Lee et al., 2016). Zde lze celý proces rozdělit na několik fází (Illumina, 2017), viz obrázek 9:

1. Příprava tzv. knihovny (library preparation), což je soubor všech fragmentů vstupujících do dalších fází procesu. Výchozí DNA je náhodně naštěpena (nejčastěji pomocí enzymu) na fragmenty, jejichž konce jsou zatupeny a na něž jsou ligovány adaptéry a v případě multiplexové analýzy i tzv. indexy k rozlišení DNA jednotlivých vzorků. Proces současně fragmentace a ligace se nazývá tagmentace. Fragmenty ligované s adaptéry, resp. s indexy, jsou amplifikovány PCR a následně přečištěny. Všechny fragmenty se sekvenují stejným primerem.
2. Tvorba clusterů – celá „knihovna“ je navázána na tzv. flow cell, tedy tzv. amplifikační destičku. Ta je tvořena osmi drážkami, jejichž povrch je pokryt oligonukleotidy komplementárními k adaptérům. Jednotlivé fragmenty knihovny jsou klonovány tzv. můstkovou (z anglického bridge) amplifikací, během amplifikace dochází k ohnutí fragmentu. Celý proces je nazýván cluster generation (vytváření shluků stejných úseků DNA). Takto vytvořené klastry jsou připravené k sekvenaci.
3. Sekvenování – sekvenační reakce probíhá simultánně na obrovském počtu templátů DNA na pevném podkladě (flow cell). Je použita technologie sekvenace syntézou SBS (Sequencing by Synthesis), kdy jsou použité terminální báze značené čtyřmi různými fluorescenčními barvami. DNA je sekvenována báze po bázi. Značené nukleotidy obsahují modifikovanou 3'-OH skupinu, což zajišťuje zařazení pouze jednoho nukleotidu v jednom cyklu. Při jednom cyklu spolu všechny nukleotidy soutěží o začlenění do řetězce. V každém sekvenčním cyklu je tedy komplementárně navázána na templát jedna z terminálních značených bází, její syntéza je detekována přístrojem pomocí laseru a podle druhu barviva je označen druh této báze. Při detekci se značka z reverzního terminátoru odštěpí. Po zaznamenání je terminátor odstraněn (reverzibilní terminátor).
4. Analýza dat – sekvence identifikované u testované DNA jsou porovnávány s referenčním genomem. Úkolem analýzy dat je převod miliónů surových dat do smysluplných informací. Získaná data jsou převedena do bioinformatických zařízení a vyhodnocena softwarem.



Obrázek 9 – Schéma celogenomové sekvenace WGS (zdroj: podle Braun 2017, upraveno)

7.2. Genotypy *M. tuberculosis*

Jednotlivé genotypy *M. tuberculosis* jsou rozmístěny po celém světě s převahou v určitých regionech (viz příloha č. 4 Fig. 1). Existují velké databáze shromažďující informace o genomových vlastnostech *M. tuberculosis* a genotypové charakteristiky jednotlivých typů. Jednou z největších je např. databáze molekulárních markerů *M. tuberculosis* SITVIT WEB (Institut Pasteur de la Gadeloupe), která zahrnuje nejdůležitější typizační markery – Spoligotypes, MIRU a VNTR, jednotlivé genotypy jsou evidovány pod číslem SIT – Spoligotyping International Type number (Demay et al. 2012). Další databází je např. MIRU-VNTR*plus* (Weniger et al. 2010). Podle genotypových charakteristik jsou klastry rozděleny do následujících genotypů – linií (Brudey et al. 2006, Demay et al. 2012, Orduz and Ribón 2015). Viz tabulka 6.

7.2.1. Haarlem

Tento genotyp se vyskytuje převážně v Evropě, především v Rusku. Zahrnuje čtyři sublinie.

7.2.2. LAM (Latin America and Mediterranean)

Genotyp LAM se velmi často vyskytuje ve Střední a Latinské Americe. Tento typ se dále dělí podle geografického výskytu – LAM10 Cameroon, LAM7 Turkey, LAM11 Zimbabwe nebo LAM12 Madrid.

7.2.3. T lineage

Tato linie zahrnuje moderní geneticky homogenní TB izoláty, které se nedají zařadit do žádné z ostatních skupin. Objevuje se relativně stejnoměrně v celém světě s maximem v Evropě. Podle geografického výskytu se rozděluje na podskupiny T1–T5.

7.2.4. X lineage

Linie X, nazývaná “Anglo-Saxon” má největší prevalenci v USA, méně pak v Latinské Americe a v Mexiku.

7.2.5. EAI (East African-Indian)

Tento typ se vyskytuje v jihovýchodní Asii, Indii a západní Africe. Je rozdělen do čtyř sublinií – EAI2 Nonhaburi, EAI6 Bangladesh/1, EAI7 Bangladesh/2 a EAI8 Madagascar.

7.2.6. CAS (Central Asian)

Linie CAS převažuje v subsaharských zemích a v Pákistánu. Zahrnuje různé podskupiny, např. CAS1 Kili (Kilimanjaro), CAS Dar (Dar-es-Salaam), and CAS1 Delhi.

7.2.7. Beijing

Genotyp Beijing je charakteristický vysokou virulencí a vysokým výskytem multirezistence. Vyskytuje se především na dálném východě Asie, zde tvoří až 50 % izolátů a v Rusku (Ei et al. 2016). Pro tyto vlastnosti je epidemiologicky nejzávažnější ze všech genotypů.

7.2.8. MANU

Tato linie pravděpodobně pochází z původního klonu genetické skupiny 1. Byla popsána v poslední době v Indii. Rozdělena je do tří podskupin – MANU 1–3.

7.2.9. Linie S

Linii S uvádějí jen někteří autoři (Brudey et al. 2006; Demay et al. 2012). Její prevalence je poměrně malá a rovnoměrná na území celého světa.

Tabulka 6 – Označení linií a sublinií *M. tuberculosis* podle jednotlivých studií a metod typizace

Linie (TB-lineage family)	Linie podle LSP Gagneux et al. 2006a		Databáze SpolDB4 family Brudey et al. 2006	Určení dle PGG Sreevatsan et al. 1997a	Určení dle TbD1 Brosch et al. 2002
Indo-Oceanic	Indo-Oceanic	1	EAI: EAI5 EAI1-SOM EAI2-Manila EAI 2- Nonthaburi EAI3-IND EAI4-VNM EAI6-BGD1, 2 EAI8-MDG	1	Ancestral
East Asian	East Asian	2	Beijing Beijing-like	1	Modern
East-African Indian	East-African Indian	3	CAS: CAS1-Delhi CAS1-Kili CAS1-variant CAS2	1	Modern
Euro-American	Euro-American	4	LAM: LAM01-10 LAM 07-TUR LAM10-CAM LAM11-ZWE LAM12-Madrid Haarlem (H) H1-3 T: T1 T1-RUS2 T2 T2-Uganda T3 T3-ETH T4 T4-CEU1 T5-Madrid2 T5-RUS Tuscany S X: X1-3 X2 variant1 X3 variant 1 a 2	2 a 3	modern
West African 1	West African 1	5	Afri2, Afri3	1	ancestral
West African 2	West African 2	6	Afri1	1	ancestral
Aethiops Vetus*		7			
<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>		BOV(1-4)	1	ancestral

* popsáno Blouin 2012, upraveno dle Shabbeer et al., 2012
Návrh názvu Aethiops Vetus: Nebenzahl-Guimaraes, 2016

7.3. Molekulárně epidemiologické studie

V molekulárně-genetických metodách se využívají znaky charakteristické pro daný bakteriální druh. Molekulární epidemiologie pak spojuje výsledky molekulární biologie s metodami epidemiologie. Cílem je přesný popis daného izolátu – stanovení genetického profilu (tzv. genetický fingerprinting), který umožní porovnání izolátů v čase a v místě záchytu. Vysoce příbuzné izoláty se nazývají klastry. U druhů *M. tuberculosis* komplexu určité klastry korelují se specifickým geografickým místem (Soini et al. 2000, Brown et al. 2010, Brudey et al. 2006 aj.). Typizace izolátů je také metodou průkazu šíření a přenosu TB.

7.4. Možnosti detekce rezistence *M. tuberculosis* v rutinní laboratoři

Pro správnou a včasnou léčbu rezistentních forem TB je nezbytná dostupnost specifických metod detekce rezistence v rutinní praxi. Klíčová je detekce rezistence k rifampicinu jako klíčovému AT v léčbě TB. U kmenů rezistentních k RIF je ve většině případů přítomna i rezistence k INH. Proto je základním markerem k určení kmenů MDR právě rezistence k RIF. Toto se uplatňuje při dg. TB zejm. v zemích s vysokým výskytem TB a omezenými možnostmi diagnostiky. V ČR se tato detekce využívá jako rychlá metoda k zahájení správné terapie, ale vždy následuje podrobné vyšetření komplexní citlivosti k AT dalšími metodami (viz výše).

K rychlé detekci rezistence k RIF se v poslední době využívá především systém GeneXpert, kdy se na principu amplifikace a hybridizace detekuje přítomnost DNA *M. tuberculosis* a přítomnost mutace pro rezistenci k RIF přímo ze vzorku klinického materiálu. Dále je možné využít detekci mutací po amplifikaci metodou reverzní hybridizace a enzymatické barevné reakce na membráně stripů (např. GenoType Hain, Hain Lifescience).

Další molekulárně-genetické metody jsou možné, ale pro rutinní praxi ne příliš vhodné.

8. Metodika

V průběhu provádění praktické části dizertační práce byla problematika rozdělena do tří oblastí. První z nich byla zaměřena na zdokonalení identifikace mykobakterií metodou hmotnostní spektrometrie a její zavedení do rutinního provozu, podrobně viz příloha č. 1. Druhá část se týkala nepřímého průkazu infekce *M. tuberculosis*, zejm. detekce latentní formy tuberkulózy, metodami IGRA, zaměření na stanovení doporučení pro využití metody Quantiferon TB Gold Plus a T-SPOT.TB, podrobně viz příloha č. 3. Třetí část byla věnována již samotné genotypizaci izolátů *M. tuberculosis*.

8.1. Identifikace mykobakterií hmotnostní spektrometrií

Tato metoda byla zvolena kvůli nutnosti zavedení nového, spolehlivého a uživatelsky vhodného postupu k identifikaci mykobakteriálních druhů.

Analýza probíhala za použití systému MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS). Za přítomnosti matrice proběhla na MALDI destičce ionizace molekul ve vzorku pomocí laseru. Pro identifikaci touto metodou byl použit postup doporučovaný výrobcem (Bruker Daltonik, Brémy, Německo). Byly testovány kmeny z 1 plné kličky z pevné vaječné půdy nebo 1 ml suspenze z tekuté půdy. Inaktivace kultury proběhla pomocí 1 ml 75% ethanolu s následnou centrifugací 5 min při 12 000×g, následovala resuspendace pelety v 500 µl sterilní destilované vody, směs byla centrifugována (5 min při 12 000×g) a výsledná peleta opět resuspendována v 50 µl sterilní destilované vody. Následovala inkubace vzorků 30 minut při 95 °C. K inaktivovaným vzorkům bylo přidáno 1,2 ml ethanolu vychlazeného na -20 °C, peleta byla vysušena při otevřené zkumavce při 35 °C (cca 10 minut). Suchá peleta byla resuspendována v 50 µl acetonitrilu. Po přidání malého množství silikátových kuliček (průměru 0,5 mm) se vzorek intenzivně vortexoval 1 min. Po promíchání bylo přidáno 50 µl 70% kyseliny mravenčí a ihned centrifugováno (5 min při 12 000×g). 1 µl Na testovací destičku pro hmotnostní spektrometrii byl nanesen 1 µl supernatantu a po usušení byl převrstveno 1 µl matrice (roztok kyseliny skořicové). Naměřená spektra byla vyhodnocena pomocí MALDI Biotyper, verze 3.0 s databází Mycobacteria Library 1.0 (bead method). Interpretace výsledků byla provedena podle hodnotových skóre a srovnáním pravděpodobnosti pořadí jednotlivých identifikovaných druhů.

Identifikace mykobakteriálních druhů hmotnostní spektrometrií byla porovnána s dalšími identifikačními metodami – klasickými, identifikací pomocí genových sond a identifikací pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA (přesný popis viz příloha č. 1).

8.1.1. Soubor

Do analýzy bylo zařazeno 30 izolátů rodu *Mycobacterium* spp. izolovaných na Ústavu mikrobiologie LF UK v Plzni a FN Plzeň (viz příloha č. 1).

8.2. Nepřímý průkaz TB metodami IGRA

Vzorky byly vyšetřeny jednak metodou QuantiFERON®-TB Gold (QFT) (Qiagen, Germany) a jednak metodou T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Ltd, UK).

Krev na QFT byla odebrána do odběrové soupravy tří zkumavek po 1 ml (TBAG, NIL a MIT), manipulace s krví proběhla podle doporučení výrobce (8-10× promícháno). Odběr na T-SPOT.TB byl proveden do zkumavky s protisrážlivým přípravkem lithium-heparinem. V obou případech byla krev doručena do laboratoře do 5 hodin po odběru. Krev pro QFT byla znovu promíchána a inkubována 16–24 hod při 37 °C.

Krev pro T-SPOT.TB byla zpracována max. 8 hodin po odběru. Separace lymfocytů probíhala pomocí zkumavek Leucosep (Oxford Immunotec Ltd, UK), počet lymfocytů byl hodnocen po obarvení trypanovou modří v jednorázové počítací mřížce. Lymfocyty byly do reakce nařazeny na standardní množství $2,5 \times 10^6$ buněk/ml.

Hodnocení výsledků probíhalo podle doporučení výrobců jednotlivých souprav. Shoda obou metod byla vyhodnocena Cohenovým kappa po vyřazení neurčených výsledků v metodě QFT.

Přesný popis metodiky viz příloha č. 3.

8.2.1. Soubor

Bylo vyšetřeno celkem 284 patientských vzorků nesrážlivé krve pacientů. Odběr krve byl proveden na klinickém pracovišti ambulantního nebo lůžkového typu. Odběry vzorků pro obě metody byly provedeny z jedné venepunkce nebo v odstupu maximálně 14 dní (průměr 3,09 dne). Byli zařazeni pacienti s různými diagnózami a různých charakteristik – viz příloha č. 3.

8.3. Genotypizace *M. tuberculosis*

V průběhu této části dizertační práce bylo cílem najít optimální metodu pro genotypizaci izolovaných kmenů *M. tuberculosis* z hlediska proveditelnosti, ekonomické dostupnosti a přesnosti. Během několika let provádění výzkumu byly zpracovány klinické izoláty různými metodami podle jejich dostupnosti v daném čase. Zkoumány byly vždy izoláty *M. tuberculosis* z klinického materiálu.

Všechny kmeny byly izolovány z klinického materiálu kultivací po dekontaminaci v automatickém systému Bactec MGIT (Becton, Dickinson and Company, USA), resp. kultivací na vaječných půdách (Trios, ČR). Dekontaminace byla provedena metodou N-acetyl-L-cystein, za použití 4% roztoku NaOH. Identifikace byla provedena imunochromatografickým testem MGIT TBc Identification Test (Becton, Dickinson and Company, USA) do komplexu *M. tuberculosis* a dále do druhu průkazem niacinu a testem TCH. Citlivost kmenů k základním AT byla stanovena v automatickém systému Bactec MGIT (Becton, Dickinson and Company, USA) a ověřena poroční metodou dle Canettiho na vaječných půdách (LabMediaServis, ČR). U rezistentních kmenů byla stanovena citlivost ke druhé řadě AT a ATB diluční metodou MIC v mikrotitračních destičkách (home made, Ústav mikrobiologie FN Plzeň).

V první fázi výzkumu byla použita metoda stanovení IS6110. Na počátku tohoto výzkumu byla tato metoda doporučována jako zlatý standard pro molekulární epidemiologii, proto byla zvolena. Byl detekován mobilní genetický element specifický pro *M. tuberculosis* – IS6110 v různém počtu kopií. Na základě variability tohoto počtu a místa transpozice u různých izolátů byly stanoveny velikosti fragmentů, stanoven profil a porovnání izolátů. Přesný popis metodiky je uveden v příloze č. 4.

Byla vyzkoušena i metoda MIRU-VNTR, ale vzhledem k tomu, že ve stejné době byla nově dostupná WGS, nebylo toto testování dokončeno.

Jako poslední byla prováděna metoda WGS. Metodika je podrobně popsána v příloze č. 5. Extrakce DNA byla provedena pomocí pufru Tris-HCl/EDTA, zahřátí na 90 °C na 2 hodiny a následného zmražení na -20 °C. Po rozmražení a centrifugaci byla DNA extrahována ze supernatantu soupravou DNA-Sorb-B kit (Sacace Biotechnologies Srl, Como, Italy). Pro přípravu knihovny multiplexových DNA byla použita souprava Nextera XT Library preparation kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Výsledné sekvence o délce 600 bp byly amplifikovány a sekvenovány na platformě Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) za použití reagenčního kitu MiSeq v3 600-cycle. Pro analýzu sekvencí byly odstraněny sekvence s nízkou kvalitou na konci čtení systémem Trimmomatic. Sekvence byly porovnávány s referenčním kmenem *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank accession NC_000962.3) na základě variability v SNP. Vyhodnocení proved bioinformatik. Spoligotypy a mutace v genech související s rezistencí vůči antibiotikům byly detekovány nahráním párovaných koncových čtení do databáze pro vyhodnocení genotypů a známých markerů rezistence z dodaných surových dat (TB Profiler, 2019).

8.3.1. Popis izolátů

Soubor 40 izolátů *M. tuberculosis* vyšetřovaných metodou WGS byl vybrán z kmenů izolovaných v Laboratoři pro diagnostiku mykobakterií Ústavu mikrobiologie FN Plzeň Národní referenční laboratoře pro mykobakteria SZÚ Praha a Zdravotního ústavu Brno tak, aby byly zastoupeny izoláty citlivé k základním AT, izoláty rezistentní s různým stupněm rezistence, dále izoláty od nemocných s místem původu v zemích s vyšším výskytem TB a pro srovnání i kmeny od nemocných s místem narození v ČR (16 ČR, 14 Rumunsko, 3 Slovensko, 3 Vietnam, 2 Bulharsko, 1 Lotyšsko, 1 Ukrajina). Do souboru byly zařazeny izoláty i z jiných laboratoří, a to z laboratoře Zdravotního ústavu Ostrava pobočky Brno, a z NRL pro mykobaktérie SZÚ Praha. Přesný popis souboru viz příloha č. 5.

9. Výsledky

Výsledky všech tří oblastí výzkumu jsou přesně interpretovány v přílohách (příloha č. 1, č. 3 a č. 5)

9.1. Identifikace mykobakterií hmotnostní spektrometrií

Z hlediska zaměření dizertační práce na *M. tuberculosis* bylo v této části práce zjištěno, že hmotnostní spektrometrie je vhodnou metodou pro identifikaci bakterií do komplexu *M. tuberculosis*, nikoliv však do jednotlivých druhů tohoto komplexu.

9.2. Nepřímý průkaz TB metodami IGRA

Pro nepřímou diagnostiku metodami QFT a T-SPOT.TB byla Cohenovým kappa zjištěna shoda – výsledný kappa index 0,72, což je podle Landise – Kocha (1977) hodnoceno jako shoda značná.

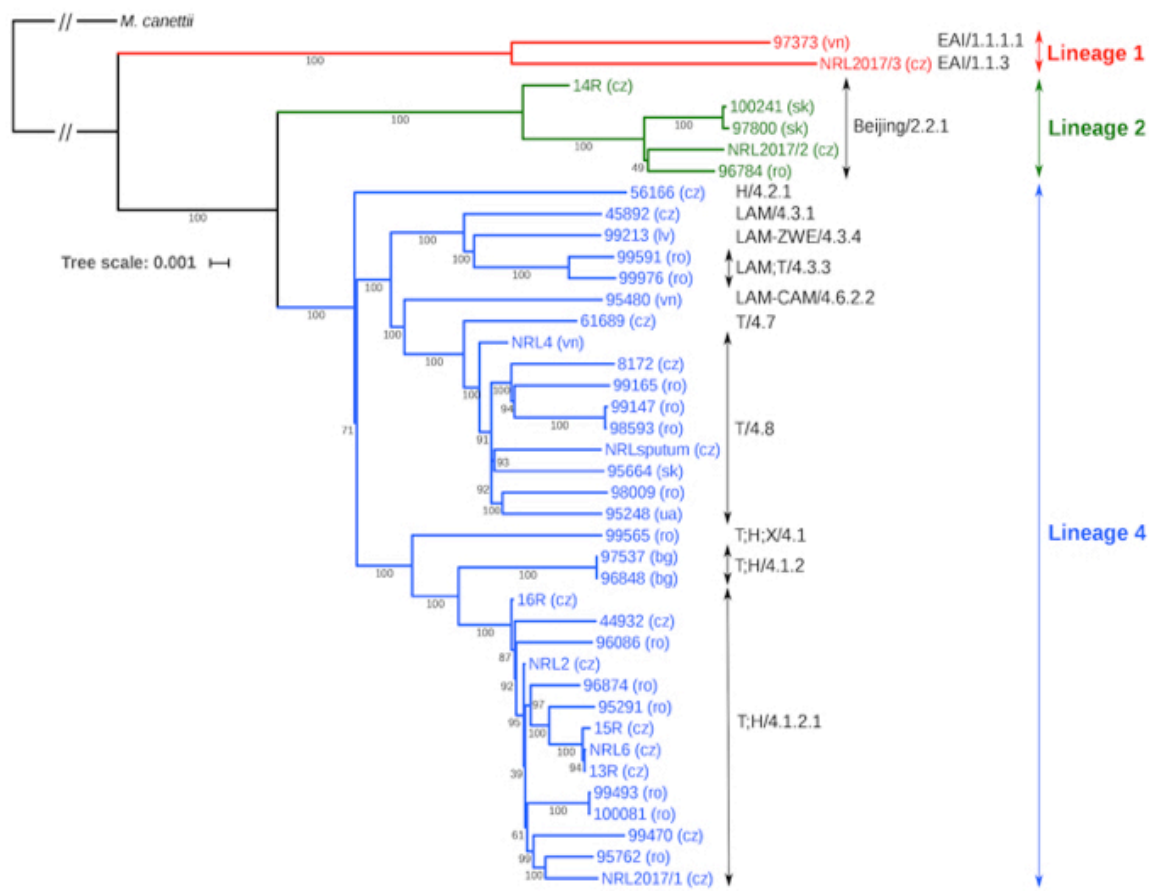
9.3. Genotypizace *M. tuberculosis*

Dílčí výsledky výzkumu byly uvedeny na mezinárodních kongresech ECCMID, viz příloha č. 6 a č. 7.

Všechny izoláty souboru byly identifikovány jako *M. tuberculosis*.

Celkem bylo identifikováno 27510 SNP. Získaný fylogenetický strom je zobrazen na obrázku č. 10, genotypový profil včetně mutací v tabulce č. 7. Země původu pacienta neměla vztah ke genotypu. Jeden kmen byl klasifikován do dvou různých spoligotypů (4.8 a 4.1.2.1), toto bylo ověřeno opakovanou sekvenací se stejným výsledkem. Po manuální kontrole bylo zjištěno, že izolát patří do spoligotypu 4.8 (specifický SNP G3836739A). Na základě tohoto výsledku jsme informovali kurátory databáze.

Byl porovnáván genotypový a fenotypový profil izolátů z hlediska rezistence k AT a ATB. Fenotypový profil byl stanoven pro streptomycin (rezistence u 12 izolátů), izoniazid (rezistence u 11 izolátů), rifampicin (rezistence u 7 izolátů), ethambutol (rezistence u 6 izolátů) a pyrazinamid (rezistence u 5 izolátů).



ČR (cz), Rumunsko (ro), Bulharsko (bg), Slovensko (sk), Vietnam (vn), Ukrajina (ua) a Lotyšsko (lv).

Obrázek 10 – Fylogenetický strom založený na SNP 40 vzorků souboru.

Tabulka 7 – Genotypový profil izolátů včetně detekovaných mutací

Drug	Mutation	Number	Percentage
Any resistance			
STM		9	23%
	gid (Lys16Arg)	4	
	rpsl (Lys43Arg)	3	
	rpsl (Lys88Arg)	1	
	rrs (A1401G)	1	
INH		8	20%
	katG (Ser315Thr)	5	
	KatG (Pro241Pro)	1	
	ahpc (C-81T promotor)	1	
	fabG1 (C-15T promotor)	1	
RIF		4	10%
	rpob (His445Arg)	1	
	rpoB (Ser450Leu)	2	
	rpoB (Asp435Val)	1	
EMB		4	10%
	embB (Met306Val)	2	
	embB (Met306Ile)	1	
	embB (Gly406Ala)	1	
PZA		2	5%
	pncA (Val128Gly)	1	
	pncA (Tyr34Stop)	1	
AMK		1	1%
	rrs (A1401G)	1	
CPR		1	1%
	rrs (A1401G)	1	
KAN		2	5%
	rrs (A1401G)	1	
	eis (G-12A promotor)	1	
ETH		1	1%
	fabG1 (C-15T promotor)	1	
Mono-resistance		8	20%
STM		4	
	gid (Lys16Arg)	3	
	rpsl (Lys43Arg)	1	
INH		4	
	katG (Ser315Thr)	3	
	KatG (Pro241Pro)	1	
Non-MDR Poly-resistance		2	5%
INH+EMB	ahpc (C-81T promotor) + embB (Met306Val)	1	
STM+INH+EMB	rpsL(Lys43Arg)+ katG (Ser315Thr)+ embB (Met306Val)	1	
MDR		4	10%
STM+INH+RIF	gid (Lys16Arg)+ katG (Ser315Thr)+ rpoB (Asp435Val)	2	
STM+INH+RIF+EMB+PZA+ETH+KAN	abG1 (C-15T promoter) & katG (Ser315Thr)+ rpoB (Ser450Leu)+	1	

Drug	Mutation	Number	Percentage
	embB (Gly406Ala)+ pncA (Tyr34Stop)+ fabG1 (C-15T promoter)+ eis (G-12A promoter)		
STM+INH+RIF+EMB+PZA+AMK+CPR+KAN	rpsL (Lys43Arg) & rrs (A1401G)+ katG (Ser315Thr)+ rpoB (Ser450Leu)+ embB (Met306Ile+ pncA (Val128Gly)+ rrs (A1401G)+ rrs (A1401G)+ rrs (A1401G)	1	

10. Diskuze

Diskuze je rozdělena podle tematických celků.

10.1. Identifikace mykobakterií hmotnostní spektrometrií

Identifikace pomocí MALDI-TOF MS je srovnatelná s jinými molekulárně-genetickými metodami identifikace mykobakteriálních druhů. Jde také o identifikaci pravděpodobnosti, což znamená nutnost vycházet při hodnocení z kontextu s ostatními výsledky, tedy např. pořadí a pravděpodobnost identifikovaných druhů, a také s ostatními diagnostickými znaky (morfologie mikroskopická i makroskopická atd.). Při dodržení těchto postupů lze výsledek identifikace uzavřít i při nižším identifikačním skóre. Hmotnostní spektrometrie se jako identifikační metoda využívá především pro netuberkulózní druhy, jako metoda spolehlivá rychlá a ekonomicky výhodná (zejména pro pracoviště, kde je k dispozici technické vybavení i pro jiné účely). Ústav mikrobiologie se podílel na mezinárodní studii, která výhody této metody prokázala, viz příloha č. 2.

Pro identifikaci *M. tuberculosis* je tato metoda využitelná také, spolehlivě identifikuje do komplexu *M. tuberculosis*, za určitých postupů (analýza spektra) i v rámci druhů komplexu (Pignone et al. 2006). Vzhledem ke snadným rutinně dostupným identifikačním postupům v identifikaci komplexu *M. tuberculosis* (průkaz MPT 64) a také určitému infekčnímu riziku se ale hmotnostní spektrometrie k těmto účelům využívá méně (Samli et al. 2016). Rozlišení druhů v rámci *M. tuberculosis* komplexu touto metodou spolehlivé není (Neuschlova et al. 2017).

V poslední době se provádějí studie zaměřené na možnost detekce rezistence *M. tuberculosis* touto metodou (Zhang et al. 2014). Tento výzkum je v začátcích, v případě úspěchu by znamenal další významný posun v diagnostice především v rutinních laboratořích.

10.2. Nepřímý průkaz TB metodami IGRA

Nízká incidence aktivní TB, vysoký ekonomický standard a vysoká úroveň zdravotní péče dovoluje a vybízí vyspělé země k detekci a řešení tuberkulózy latentní (LTB). Jde zejména o detekci LTB u kontaktů s aktivní TB, dále u pacientů před nasazením a na biologické léčbě, u pacientů s primárním plicním onemocněním (tumory, sarkoidóza, silikóza, CHOPN, cystická fibróza atd.). Nepřímý průkaz je jedinou možností, jak LTB detekovat. Situaci komplikuje skutečnost, že průkaz protilátek není vhodný vzhledem k typu imunitní odpovědi na přítomnost tuberkulózních bacilů. Metodou volby je průkaz reakce buněčné imunity. Historicky využívaný tuberkulinový kožní test má mnoho omezení a jeho specifita i senzitivita nejsou příliš vysoké. Velký zlom v diagnostice znamenalo právě zavedení IGRA metod. Každá z dostupných metod (QFT a T-SPOT.TB) je používána v rutinním provozu s různým zastoupením. Metoda QFT je mnohem častěji využívána kvůli jednoduššímu provedení, menší náročnosti na personální i technické vybavení. Metoda T-SPOT.TB je ovšem senzitivnější (Lee et al. 2006). Podle našich zkušeností se v praxi ukazuje jako výhodný postup využívat metodu QFT jako screeningovou. V případě neurčitých výsledků, nebo výsledků nejednoznačně interpretovatelných v souvislosti s hodnotou cut off i s klinickými a dalšími nálezy u pacienta se osvědčila

konfirmace metodou t-SPOT.TB. Interpretace komplexního výsledku IGRA je tak mnohem přesnější a je validním přínosem do diagnostiky TB.

10.3. Genotypizace *M. tuberculosis*

Diagnostika TB má v rozvinutých zemích vysoký standard. K účinné kontrole epidemiologické situace TB je kromě přesné diagnostiky nutné ale také zaměřit pozornost na šíření této nemoci. Epidemiologická opatření jsou v ČR nastavena na vysoké úrovni, mají oporu v zákonech (vyhláška č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce, novela Sbírka zákonů č. 275 / 2010), TB patří mezi povinně hlášená a léčená onemocnění. V posledních letech se pro epidemiologické účely stává klíčovou právě genotypizace izolovaných kmenů od konkrétních pacientů. Pomocí ní lze stanovovat dynamiku přenosu tohoto onemocnění včetně zdroje infekce a způsobu přenosu, případně i výjimečné případy laboratorní zkřížené kontaminace. Významnosti tato problematika nabývá v době, kdy sílí migrace obyvatel ze zemí s vysokým výskytem TB.

Genotypizace TB se již stala hlavní součástí celosvětového programu kontroly TB koordinovaného WHO. V některých rozvinutých zemích (např. Velká Británie) byla implementována Národní služba genotypizace TB (NTGS) (NHS England, 2015). WGS-NGS je jedním z nejlepších nástrojů pro tyto účely (Gardy et al. 2011).

Na základě podrobných epidemiologických charakteristik lze předpokládat vývoj jednak samotné incidence TB, ale také rozšíření rezistentních kmenů. Pak je možné na základě těchto znalostí tvořit účinné strategie epidemiologických opatření a např. postup a metody pro vyšetřování cizinců v rámci státu i Evropy.

WGS-NGS je vhodná pro sledování *M. tuberculosis* především kvůli jeho pomalému růstu a minimální genomické diverzitě. Dle Bryanta et al. (2013a) analýzy prokázaly, že průměrná rychlost vzniku mutací je přibližně 0,3 SNP na genom za jeden rok. Tato metoda umožní relativně rychlé stanovení jak rezistence vůči antibiotikům, tak zjištění informací způsobu přenosu a nákazy (Schürch et al. 2010). Lze předpokládat, že během dalšího vývoje a výzkumu budou dostupné i testy WGS pro detekci mutací rezistence a genotypizace přímo ze vzorků klinického materiálu (Brown et al. 2015).

Z různých studií, např. Martínézové et al., vyplývá, že shoda mezi fenotypovou metodou testování citlivosti a WGS detekcí mutací může být až 100 % (Martinez et al. 2016). Z několika důvodů je ale správně standardními postupy doporučeno interpretovat molekulárně genetické metody, ať detekce mutací rezistence nebo jakékoliv jiné, vždy současně s provedením fenotypových metod. U testování citlivosti to může být např. z důvodu heterogenity izolátů, přítomnosti několika kmenů současně, dále např. neexprimovaných genů rezistence. WGS přispívá k diagnostice kromě rozšíření detekčních možností také výrazným zkrácením diagnostické doby, tedy první orientace v informaci o izolovaném kmeni. To má bezprostřední dopad na rychlost a správnost zahájení léčby i epidemiologických šetření a opatření. Definitivní výsledek následuje pak s odstupem po konfirmaci

s fenotypovou metodou. Např. studie Martinezové et al. doložila zkrácení detekční doby o 5 dnů (z 16 dnů fenotypové metody na 11 dnů u WGS) (Martinez et al. 2016).

Zaměřím-li se na výsledky testování výše zmíněného souboru, lze potvrdit paralelu s dosavadními publikovanými výsledky v jiných výzkumech. Testované kmeny byly rozloženy do několika linií, což odpovídá předpokladu, že se kmeny na území střední Evropy šíří z mnoha geografických oblastí. Nejvíce kmenů (n 27) patřilo k linii T s rovnoměrným rozložením ve světě a maximem v Evropě, v našem souboru především Rumuni (n 11) Bulhaři (n 2) a Češi (n 8). Pět kmenů bylo zařazeno do linie LAM (Střední a Latinská Amerika, ale také např. Turecko), do této linie patřily kmeny od pacientů z ČR, Vietnamu, Rumunska a Litvy. Linie Beijing, která je považována za epidemiologicky nejzávažnější z hlediska vysoké patogenity a vysoké rezistence, byla zaznamenána u 5 kmenů (2 Slovensko, 2 Češi, 1 Rumun). Tato linie má vysokou prevalenci v Asii a Rusku. Linie Haarlem vyskytující se převážně v Evropě, byla zachycena překvapivě jen u jednoho kmene, českého pacienta. Zbývající 2 kmeny patřily do linie EA.

Některé studie se věnovaly myšlence, zda se určité genotypové linie liší patogenitou, nebo zda jejich zastoupení závisí i na jiných faktorech. Click et al. prezentují výsledky z rozsáhlého výzkumu na 53972 TB kultivačně pozitivních pacientech s plicní, mimoplicní a současně plicní i mimoplicní TB. Z jejich výsledků vyplývá, že dvě linie Indo-oceanic (1) a East-African Indian (3) statisticky významně predisponují ke vzniku výlučně extrapulmonárních forem TB, bez ohledu na další faktory, jako jsou rasa, HIV status, pohlaví a věk (Click et al. 2015). U linie East-African Indian (genotyp CAS) totéž prokázala italská studie (Lari et al. 2009). Linie East Asian (2) genotyp Beijing, tedy genotyp s vysokou patogenitou a vysokou mírou rezistence, se pojí především s plicní formou TB, která je nejnápadněji přenositelná mezi lidmi (Dale et al. 2005). Proto jsou lepší podmínky k šíření a vývoji tohoto genotypu, než např. u linie 1 a 3. Tyto výzkumy předurčují další možnosti sledování TB linií z hlediska patogenity a dopadu na pacienta. V našem souboru tyto rozdíly prokázány nebyly kvůli malému počtu kmenů.

Čtyři kmeny vyšetřovaného souboru vykazovaly rezistenci typu MDR (10 %), výskyt rezistence byl rozložen mezi různé klady a linie. Výskyt MDR kmenů v rámci ČR se v posledních letech udává mezi 1 a 3 % (2,7 % v roce 2015, 1,7% ve 2016, 2,3 % ve 2017) (ÚZIS 2016, ÚZIS 2017, ÚZIS 2018). Vyšší počet MDR kmenů v našem souboru je důsledkem nereprezentativního složení souboru z hlediska zastoupení typů pacientů pozitivních na TB na území ČR. Fylogenetický strom byl vytvořen na základě přístupu založeného na SNP, tento způsob může být použit jako standard pro generování fylogeneze (Brown et al. 2015). Ve velkých studiích (např. v letech 2010–2013 v Minsku) bylo prokázáno, že MDR a XDR kmeny náleží především ke genotypu Beijing (Wollenberg et al. 2017). Předpokládá se, že MDR typ rezistence pacient získá většinou přímou nákazou již rezistentním kmenem. Na rozdíl od typu rezistence XDR, kdy se se stejnou pravděpodobností rezistence k AT a

ATB druhé řady vyvine de novo během léčby, především ve skupině fluorochinolonů (Wollenberg et al. 2017).

V posledních letech právě díky zavedení WGS do praxe se objevují studie zabývající se případy outbreaků TB a typizací kmenů *M. tuberculosis* v nich zachycených. Ve Francii v letech 2017–2018 proběhl outbreak infekcí TB způsobený genotypem Beijing celkem u 14 osob, kdy bylo pomocí WGS potvrzeno, že se jedná o stejný kmen (klaster) (Genested et al. 2019). Folkvardsen et al. popisují outbreak TB v Dánsku způsobený specifickým klastrem, který se s vysokou incidencí vyskytuje ve Skandinávii. Sledovali a popsali jeho šíření v letech 1992–2014 detekcí a porovnáním SNP, RFLP a MIRU-VNTR (Folkvardsen et al. 2018). Roetzer et al. využili WGS k analýze outbreaku TB (86 izolátů v sedmi klastrech a 36 unikátních profilech SNP) způsobeným genotypem Haarlem v letech 1997–2010 v SRN (Roetzer et al. 2013). V této studii také potvrdili, že WGS představuje v současné době nej přesnější nástroj genotypizace *M. tuberculosis*, protože výsledky původní genotypizace konvenčními metodami byly zásadně přehodnoceny po přetestování WGS (Roetzer et al. 2013).

V některých případech se může objevit infekce TB smíšená, tedy způsobená více než jedním kmenem. Stejně jako reinfekce se toto častěji vyskytuje v zemích s vysokou incidencí TB, např. v Africe, v Asii. Vysoká četnost reinfekcí se také vyskytuje v souvislosti s pozitivitou HIV (Bryant et al. 2013b). Bylo prokázáno, že vzhledem k vysoké stabilitě genomu *M. tuberculosis* se u relapsů infekce, na rozdíl od reinfekcí, nevyskytují (resp. v minimální míře) variace SNP ve smyslu inzercí nebo delecí (Bryant et al. 2013b).

11. Závěr

V dizertační práci bylo zpracováno hlavní téma – molekulárně genetická analýza *M. tuberculosis* včetně stanovení vhodné metody pro genotypizaci patientských kmenů pro epidemiologické účely a případně detekci mutací zodpovědných za rezistenci *M. tuberculosis* pro účely epidemiologické i klinické – WGS. Byla zpracována i vedlejší témata – možnost identifikace mykobakterií metodou hmotnostní spektrometrie a dále analýza svou dostupných metod na principu IGRA a jejich využití v klinické diagnostice.

Výsledek předloženého výzkumu by se mohl stát základem pro ustanovení systematické genotypizace všech izolátů *M. tuberculosis* izolovaných od pacientů v České republice. Volba metody WGS je předurčena minimální genetickou diverzitou *M. tuberculosis*. Při postupném zavádění genotypizace v této oblasti by měly být priority zaměřené na rezistentní, resp. především MDR izoláty, a dále pak na izoláty od osob ze zemí původu mimo ČR, resp. zejména ze zemí s vysokým výskytem TB. Provádění této molekulárně-epidemiologické charakteristiky povede k přesnému zmapování situace ve smyslu šíření jednotlivých genotypů TB, tedy ke zjištění, zda na území ČR kolují podobné kmeny, nebo zda jsou sem zavlečeny kmeny z jiných geografických oblastí. Dále se touto analýzou jednoznačně ozřejmí vzájemné nákazy pacientů, kteří byli v kontaktu s TB nemocným, tedy šíření TB v okolí nemocného. A v neposlední řadě tato typizace umožní odlišení reinfekce a relapsu původní nevyhojené infekce TB.

Molekulárně-genetická analýzy samozřejmě představuje určité ekonomické i provozní náklady. Ty se ale v dlouhodobém horizontu zcela jistě vyplatí, protože na základě tohoto poznání může stát prostřednictvím vyhlášek regulovat a cíleně organizovat epidemiologickou problematiku, tzn. očkovací strategii, stupeň karanténních opatření, vyhledávání rizikových osob atd. Výsledky tohoto typu analýzy umožňují také srovnávací analýzy mezi státy v rámci Evropy i světa. WGS je pro tento účel jednoznačně metodou volby. Sekvenování *M. tuberculosis* v celých genomech umožňuje diferencovat izoláty s mnohem větším rozlišením.

WGS může zlepšit molekulární epidemiologický dohled, kontrolu i léčbu TB, ale i jiných infekčních nemocí, např. invazivních infekcí způsobených meningokoky. Implementace WGS do laboratoří bude podpořena dalšími výzkumy, dostupností nových výkonných typů sekvencerů, levnějším provozem a také vývojem bioinformatiky.

Literatura

1. Ahmed MM, Velayati AA, Mohammed SH, 2016. Epidemiology of multidrug-resistant and totally drug resistant tuberculosis in Middle East countries. *Int J Mycobacteriol.* 5:249–256
2. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, et al., 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis.* [online]. 16(8):1296-1299 [cit. 5.9.2018], Dostupné z: DOI: 10.3201/eid1608.100314
3. Ansong WJ, 2016. Next Generation DNA Sequencing (II): Techniques, Applications. *Next Generat Sequenc & Applic Si:* 005, ISSN:2469-9853
4. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L, 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov., *Int J Syst Evol Microbiol.* Nov;53(Pt 6):1785-9
5. Arbex MA, Varella MCL, de Siqueira HR, de Mello FAF, 2010a. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First line drugs. *J bras pneumol.* Sep-Oct;36(5):626-40. ISSN 1806-3713
6. Arbex MA, Varella MCL, de Siqueira HR, de Mello FAF, 2010b. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs.. *J bras pneumol.* Sep-Oct;36(5):641-56. ISSN 1806-3713
7. Baker L, Brown T, Maiden MC, Drobniewski F, 2004. Silent Nucleotide Polymorphisms and a Phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis.* [online]. 10(9):1568-1577. [cit. 15.5.2018], Dostupné z: DOI:10.3201/eid1009.040046
8. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR Jr, 1994. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*, *Science.* [online]. Jan 14;263(5144):227-30. [cit. 10.4.2018], Dostupné z: DOI: 10.1126/science.8284673
9. Barnes PF, Cave MD, 2003. Molecular Epidemiology of Tuberculosis, *N Engl J Med.* [online]. 349:1149-1156. [cit. 10.4.2018], Dostupné z: DOI: 10.1056/NEJMra021964
10. Baron S, 1996. Medical Microbiology. 4. vydání, Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. ISBN-10: 0-9631172-1-1
11. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P, 2007. "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes". *Science* [online]. 315(5819): 1709–1712. [cit. 10.3.2018], Dostupné z: DOI: 10.1126/science.1138140
12. Belanger AE, Besra GS, Ford ME, et al., 1996. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 15, 93(21):11919-11924
13. Bifani P, Moghazeh S, Shopsis B, Driscoll J, Ravikovitch A, Kreiswirth BN, 2000. Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra Variants: Distinguishing the Mycobacterial Laboratory Strain. *J Clin Microbiol.* 38(9):3200-3204.
14. Bigi F, Caimi KC, Golby P, Hinds J, Cataldi A, Gordon SV, Romano MI, 2005. Identification of genetic markers for *Mycobacterium pinnipedii* through genome analysis. *FEMS microbiology letters* [online]. 248(2), 147-152 [cit. 3.6.2016]. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.femsle.2005.05.034. ISSN 03781097.
15. BioLib Biological Library, 2016 [online]. BioLib, z. s. [cit. 3.8.2016]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id652871/>
16. Blouin Y, Hauck Y, Soler C, et al., 2012. Significance of the identification in the Horn of Africa of an exceptionally deep branching *Mycobacterium tuberculosis* clade. *PLoS One.* [online]. 7(12):e52841. [cit. 3.4.2019]. Dostupné z: DOI: 10.1371/journal.pone.0052841
17. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC, 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol.* 28(8):1751-1759
18. Borsuk S, Newcombe J, Mendum TA, Dellagostin OA, McFadden J, 2009. Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS. *Tuberculosis (Edinb).* [online]. Nov;89(6):423-30. [cit. 10.4.2018], Dostupné z: DOI: 10.1016/j.tube.2009.07.003
19. Braun MS, 2017. Sequencing-by-Synthesis: Explaining the Illumina Sequencing Technology. [online] BiteSizeBio [cit. 04-07-2017] Dostupné z: <http://bitesizebio.com/13546/sequencing-by-synthesis-explaining-the-illumina-sequencing-technology/>

20. Brosch R, Philipp WJ, Stavropoulos E, Colston MJ, Cole ST, Gordon SV, 1999. Genomic Analysis Reveals Variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the Attenuated *M. tuberculosis* H37Ra Strain. *Infect Immun.* 67(11):5768-5774.
21. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C et al., 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3684-3689
22. Brown T, Nikolayevskyy V, Velji P, Drobniewski F, 2010. Associations between *Mycobacterium tuberculosis* strains and phenotypes. *Emerg Infect Dis.* [online]. 16:272-280. [cit. 4.7.2017] Dostupné z: DOI: 10.3201/eid1602.091032
23. Brown AC, Bryant JM, Einer-Jensen K, Holdstock J, Houniet DT, Chan JZ, Depledge DP, Nikolayevskyy V, Broda A, Stone MJ, Christiansen MT, 2015. Rapid whole genome sequencing of *M. tuberculosis* directly from clinical samples. *J Clin Microbiol.* [online]. 53(7):2230-7. [cit. 28.5.2019] Dostupné z: DOI: 10.1128/JCM.00486-15
24. Bryant JM, Schürch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, Kremer K, van Hijum SA, Siezen RJ, Borgdorff M, Bentley SD, Parkhill J, van Soolingen D, 2013a. Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis.* [online]. Feb 27;13:110. [cit. 29.5.2019] Dostupné z: DOI: 10.1186/1471-2334-13-110.
25. Bryant JM, Harris SR, Parkhill J, et al., 2013b. Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective observational study. *Lancet Respir Med.* [online]. 1(10):786-792. [cit. 29.5.2019] Dostupné z: DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70231-5
26. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S et al, 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* [online]. Mar 6;6:23. [cit. 15.5.2016], Dostupné z: DOI: 10.1186/1471-2180-6-23
27. Burgos MV, Méndez JC, Ribon W, 2004. Molecular epidemiology of tuberculosis: methodology and applications. *Biomedica* 24(Suppl 1):188-201
28. Calmette A, Guérin C, 1913. Nouvelles recherches expérimentales sur la vaccination des bovidés contre la tuberculose et sur le sort des bacilles tuberculeux dans organisme des vaccinés. *Ann Inst Pasteur*, 27:162-169
29. Calmette A, Guérin C, Weill-Hallé B. et al., 1924. Essais d'immunisation contre l'infection tuberculeuse. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, XCI, pp. 787-796
30. Cambau E, 2011. Resistance to anti-tuberculous drugs, Educational Workshop arranged with the ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS) [online]. ECCMID Milan, Italy. 7.-10.5.2011. [cit. 17.4.2016], Dostupné z: [https://www.google.cz/search?ei=F5PBX\]2QAoOZjLsP5oqVmAk&q=Cambau+E%2C+2002.+Resistance+to+anti-tuberculous+drugs%2C+Educational+Workshop+&oq=Cambau+E%2C+2002.+Resistance+to+anti-tuberculous+drugs%2C+Educational+Workshop+&gs_l=psy-ab.3...162239.167166..167844...o.o..o.90.411.5.....o....2j1..gws-wiz.B-utgxyHpka](https://www.google.cz/search?ei=F5PBX]2QAoOZjLsP5oqVmAk&q=Cambau+E%2C+2002.+Resistance+to+anti-tuberculous+drugs%2C+Educational+Workshop+&oq=Cambau+E%2C+2002.+Resistance+to+anti-tuberculous+drugs%2C+Educational+Workshop+&gs_l=psy-ab.3...162239.167166..167844...o.o..o.90.411.5.....o....2j1..gws-wiz.B-utgxyHpka)
31. Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST, 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv., *Microbiology.* Oct;148(Pt 10):2967-73.
32. Canetti G, Fox W, Khomenko A, et al., 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bulletin of the World Health Organization.* 41(1):21-43.
33. Castets M, Boisvert H, Grumbach F, Brunel M, Rist N, 1968. Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note (Article), *Revue de tuberculose et de pneumologie*, 32(2): 179-184
34. Cegielski P, Nunn P, Kurbatova EV, et al., 2012. Challenges and Controversies in Defining Totally Drug-Resistant Tuberculosis. *Emerg Infect Dis.* [online]. 18(11):e2. [cit. 12.8.2016], Dostupné z: DOI: 10.3201/eid1811.120526.
35. Click ES, Moonan PK, Winston CA, Cowan LS, Oeltmann JE, 2012. Relationship Between *Mycobacterium tuberculosis* Phylogenetic Lineage and Clinical Site of Tuberculosis. *Clin Infect Dis.* [online]. 54(2):211-219. [cit. 29.5.2019], Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/cid/cir788>
36. Cock PJA, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM, 2010. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research.* [online]. 38(6):1767-1771. [cit. 26.4.2016], Dostupné z: DOI: 10.1093/nar/gkp137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847217/>

37. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393:537–544
38. Cole ST., 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* [online]. 148:2919–2928, [cit. 29.7.2017], Dostupné z: DOI: 10.1099/00221287-148-10-2919
39. Collins CH, Grange JM, Yates MD, 1997. *Tuberculosis bacteriology, Organisation and Practise*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, ISBN 0750624582
40. Coros A, DeConno E, Derbyshire KM, 2008. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Insertion Sequence, Is Also Present in the Genome of *Mycobacterium smegmatis*, Suggestive of Lateral Gene Transfer among Mycobacterial Species. *J Bacteriol.* [online]. 190(9):3408–3410. [cit. 22.4.2017], Dostupné z: DOI: 10.1128/JB.00009-08.
41. Dale JW, Bothamley GH, Drobniewski F, Gillespie SH, McHugh TD, Pitman R, 2005. Origins and properties of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in London. *J Med Microbiol.* [online]. 54(Pt6):575–82. [cit. 29.5.2019], Dostupné z: DOI: 10.1099/jmm.0.45959-0
42. Dall’Stella R, Krieger MA, Burger M, Agottani JB, Chahad-Ehlers S, Thomaz-Soccol V, 2007. Development of bioprocess for the production of purified protein derivative with Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis use. *J Biotechnol.* [online]. 132(2):278–87. [cit. 25.4.2017], Dostupné z: DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.007
43. Da Silva Almeida PE, Palomino JC, 2011. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother.* [online]. 66(7), 1417–30 [cit. 25.4.2017], Dostupné z: DOI: 10.1093/jac/dkr173
44. David HL, Jahan MT, Jumin A, Grandry J, Lehman HE, 1978. Numerical Taxonomy Analysis of *Mycobacterium africanum*. *Int J Syst Evol Microbiol.* [online]. 28: 467–472. [cit. 25.8.2016], Dostupné z: DOI: 10.1099/00207713-28-4-464
45. Davidová R, 2001. Současné názory na léčbu a chemoprophylaxi TBC. *Zdravotnické noviny* č. 15, Lékařské listy, s. 28, ISSN 0044-1996
46. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodriguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A, 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov., *Int J Syst Evol Microbiol* [online]. 53, 1305–1314, [cit. 12.5.2016], Dostupné z: DOI: 10.1099/ijvs.0.02401-0
47. De Groote MA, Gruppo V, Woolhiser LK, Orme IM, Gilliland JC, Lenaerts AJ, 2012. Importance of Confirming Data on the In Vivo Efficacy of Novel Antibacterial Drug Regimens against Various Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* [online]. 56(2):731–738, [cit. 14.8.2017], Dostupné z: DOI: 10.1128/AAC.05701-11
48. De Jong BC, Antonio M, Gagneux S, 2010a. *Mycobacterium africanum* – Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* [online]. 4(9):e744. [cit. 2.9.2017], Dostupné z: DOI: 10.1371/journal.pntd.0000744.
49. De Jong BC, Hammond A, Otu JK, Antonio M, Adegbola RA, Ota MO, 2010b. Immunogenicity of antigens from the TbD1 region present in *M. africanum* and missing from “modern” *M. tuberculosis*: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* [online] 10:11. [cit. 5.9.2017], Dostupné z: DOI: 10.1186/1471-2334-10-11.
50. Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov i, Sola C, Zozio T, Rastogi N, 2012. SITVITWEB – a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology, *Infect Genet Evol.* [online]. 12 (4), pp. 755–766, [cit. 10.10.2017], Dostupné z: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.004>
51. Desikan S, Narayanan S, 2015. Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res.* [online]. 141(6):761–774. [cit. 10.5.2018], Dostupné z: DOI: 10.4103/0971-5916.160695. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4525401/>
52. Dheda K, Gumbo T, Gandhi NR, Murray M, Theron G, Udwadia Z, Migliori GB, Warren R, 2014. Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis, *Lancet Respir Med.* [online]. 2:321–38, [cit. 18.3.2017], Dostupné z: DOI: [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(14\)70031-1](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(14)70031-1)
53. Dippenaar A, Parsons SD, Sampson SL, van der Merwe RG, Drewe JA, Abdallah AM, Siame KK, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Pain A, Warren RM, 2015. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*, *Tuberculosis (Edinb).* [online]. Dec;95(6):682–8. [cit. 13.10.2017], Dostupné z: DOI: 10.1016/j.tube.2015.10.001

54. Doležal M, Opletalová V, Kešetovičová D, 2008. *Výzkum nových antituberkulotik odvozených od pyrazinu na Farmaceutické fakultě v letech 1997-2007*, Hradec Králové, Konference SAL 2008, Chem. Listy 102, s 194
55. Donoghue HD, 2011. Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis, *Clin Microbiol Infect* [online]. 17: 821-829, [cit. 4.7.2017], Dostupné z: DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03554.x>
56. Ei PW, Aung WW, Lee JS, Choi G-E, Chang CL, 2016. Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a Review of Frequently Used Methods. *J Korean Med Sci* [online]. 31(11):1673-1683. [cit. 14.7.2017], Dostupné z: DOI: [10.3346/jkms.2016.31.11.1673](https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.11.1673)
57. Feuerriegel S, Schleusener V, Beckert P, et al., 2015. PhyResSE: a Web Tool Delineating *Mycobacterium tuberculosis* Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol.* [online]. 53(6):1908-1914. [cit. 10.7.2018], Dostupné z: DOI: [10.1128/JCM.00025-15](https://doi.org/10.1128/JCM.00025-15).
58. Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, et al., 2006. Global Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis: Insights into Tuberculosis Evolution, Phylogenetic Accuracy of Other DNA Fingerprinting Systems, and Recommendations for a Minimal Standard SNP Set. *J Bacteriol.* [online]. 188(2):759-772. [cit. 10.8.2018], Dostupné z: DOI: [10.1128/JB.188.2.759-772.2006](https://doi.org/10.1128/JB.188.2.759-772.2006).
59. Flores L, Van T, Narayanan S, DeRiemer K, Kato-Maeda M, Gagneux S, 2007. Large Sequence Polymorphisms Classify *Mycobacterium tuberculosis* Strains with Ancestral Spoligotyping Patterns. *J Clin Microbiol.* [online]. 45(10):3393-3395. [cit. 10.7.2018], Dostupné z: DOI: [10.1128/JCM.00828-07](https://doi.org/10.1128/JCM.00828-07).
60. Folkvardsen DB, Norman A, Andersen AB, Rasmussen EM, Lillebaek T et al., 2018. A Major *Mycobacterium tuberculosis* outbreak caused by one specific genotype in a low-incidence country: Exploring gene profile virulence explanations. *Scientific Reports.* [online]. vol 8, article number:11869 [cit. 10.5.2019], Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-30363-3>
61. Forshaw D, Phelps GR, 1991. Tuberculosis in a captive colony of pinnipeds. *J Wildl Dis.* [online]. 27(2):288-295. [cit. 26.5.2018], Dostupné z: DOI: <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-27.2.288>
62. Frith J, 2014a. History of Tuberculosis. Part 1 – Phthisis, consumption and the White Plague, *J Mil Veterans Health.* [online]. June 2014; 22(2), 29-35, [cit. 26.5.2018], Dostupné z: <http://jmvh.org/article/history-of-tuberculosis-part-1-phthisis-consumption-and-the-white-plague/>
63. Frith J, 2014b. History of Tuberculosis. Part 2 – the Sanatoria and the Discoveries of the Tubercle Bacillus, *J Mil Veterans Health.* [online]. June 2014; 22(2), 36-41 [cit. 26.5.2018], Dostupné z: <http://jmvh.org/wp-content/uploads/2014/08/Frith-Part-2.pdf>
64. Frota CC, Hunt DM, Buxton RS, et al., 2004. Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiology (Reading, England)* [online]. 150(Pt 5):1519-1527. . [cit. 13.10.2017], Dostupné z: DOI: [10.1099/mic.0.26660-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.26660-0)
65. Fujiwara M, Kawasaki M, Hariguchi N, Liu Y, Matsumoto M, 2018. Mechanisms of resistance to delamanid, a drug for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* [online]. Jan;108:186-194. [cit. 13.10.2017], Dostupné z: DOI: [10.1016/j.tube.2017.12.006](https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.12.006)
66. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S et al., 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*, *PNAS* [online]. June 24, vol. 100, no. 13 [cit. 16.10.2017], Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/100/13/7877.full.pdf>
67. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, et al., 2006a. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [online]. 103(8):2869-2873. [cit. 16.10.2017], Dostupné z: DOI: [10.1073/pnas.0511240103](https://doi.org/10.1073/pnas.0511240103)
68. Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannan BJ. 2006b. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, Jun 30;312(5782):1944-6
69. Gagneux S, Small PM, 2007. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* [online]. 7:328-337. [cit. 16.10.2017], Dostupné z: DOI: [10.1016/S1473-3099\(07\)70108-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70108-1)
70. Gagneux S, 2009. Strain Variation and Evolution In: Parish T, Brown A, *Mycobacterium: Genomics and Molecular Biology*, Caister Academic Press 2009, str. 2-3. ISBN: 978-1-904455-40-0
71. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui JS, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK, Elwood K, Jones SJM, Brinkman FSL, Brunham RC, Tang P, 2011. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med.* [online]. 24:364(8):730-739. [cit. 26.5.2019], Dostupné z: DOI: [10.1056/NEJMoa1003176](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003176)

72. Genestet C, Tatai C, Berland J, et al., 2019. Prospective Whole-Genome Sequencing in Tuberculosis Outbreak Investigation, France, 2017–2018. *Emerg Infect Dis.* [online]. 25(3):589-592. [cit. 27.5.2019], Dostupné z: DOI: 10.3201/eid2503.181124
73. Gillespie SH, 2002. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob Agents Ch.* [online]. 46(2):267-274. [cit. 17.10.2017], Dostupné z: DOI: 10.1128/AAC.46.2.267-274.2002
74. Gutacker MM, Mathema B, Soini H, Shashkina E, Kreiswirth BN, Graviss EA, Musser JM, 2006. Single-Nucleotide Polymorphism-Based Population Genetic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strains from 4 Geographic Sites. *J Infect Dis.* [online]. 193 (1): 121-128. [cit. 18.10.2017], Dostupné z: DOI: 10.1086/498574
75. Gutiérrez M, Samper S, Jimenez MS, van Embden JDA, Marin JF, Martin C, 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J Clin Microbiol* 35, 3328–3330.
76. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, et al., 2005. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens.* [online]. 1(1):e5. [cit. 18.10.2017], Dostupné z: DOI: 10.1371/journal.ppat.0010005.
77. Handzel ZT, 2013. The Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Humans, Tuberculosis – Current Issues In: *Diagnosis and Management*, Bassam H. Mahboub and Mayank G. Vats, *InTech.* [online]. [cit. 20.1.2017], Dostupné z: DOI: 10.5772/54986.
78. Heym B, Zhang Y, Poulet S, Young D, Cole ST, 1993. Characterization of the katG gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 175(13):4255-4259.
79. Heym B, Saint-Joanis B, Cole ST, 1999. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle Lung Dis.* [online]. 79(4):267-271. [cit. 4.1.2018], Dostupné z: DOI: 10.1054/tuld.1998.0208
80. Hippocrates (460-370 BCE). Book 1 – Of the Epidemics. In: Adams F (translator). *The Genuine Works of Hippocrates.* London: The Sydenham Society, 1849. Facsimile edition, The Classics of Medicine Library, Alabama, 1985, p. 352-354
81. Homolka J, 2016. *Tuberkulóza.* 5. upravené vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3476-0.
82. Huard RC, de Oliveira Lazzarini LC, Butler WR, Van Soolingen D, Ho JL, 2003. PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions. *J Clin Microbiol.* [online]. 41(4):1637-1650. [cit. 20.11.2017], Dostupné z: DOI: 10.1128/JCM.41.4.1637-1650.2003.
83. Huard RC, Fabre M, de Haas P, Lazzarini LCO, Van Soolingen D, Cousins D, Ho JL, 2006. Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *J. Bacteriol.* [online]. June 2006 vol. 188 no. 12 4271-4287 [cit. 18.10.2017], Dostupné z: [cit. 18.10.2017], Dostupné z: DOI: 10.1128/JB.01783-05 <http://jb.asm.org/content/188/12/4271.full.pdf>
84. Hughes AL, Friedman R, Murray M, 2002. Genomewide Pattern of Synonymous Nucleotide Substitution in Two Complete Genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis.* [online]. 8(11):1342-1346. [cit. 12.1.2017], Dostupné z: DOI: 10.3201/eid0811.020064.
85. Chen J, Zhang S, Cui P, Shi W, Zhang W, Zhang Y, 2017. Identification of novel mutations associated with cycloserine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* [online]. 72(12):3272–3276. [cit. 8.10.2018], Dostupné z: DOI: 10.1093/jac/dkx316
86. Cholo MC, Mothiba MT, Fourie B, Anderson R, 2017. Mechanisms of action and therapeutic efficacies of the lipophilic antimycobacterial agents clofazimine and bedaquiline. *J Antimicrob Chemother.* [online]. 72: 338–353 [cit. 4.5.2018], Dostupné z: DOI: 10.1093/jac/dkw426
87. Illumina, 2017. *An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology* [online] Illumina 2017 [cit. 03-07-2017] Dostupné z: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>
88. Ioerger TR, Feng Y, Ganesula K, et al, 2010. Variation among Genome Sequences of H37Rv Strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Multiple Laboratories . *J Bacteriol.* [online]. 192(14):3645-3653. [cit. 4.6.2018], Dostupné z: DOI: 10.1128/JB.00166-10.
89. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J, 2014. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *BioMed Res Int.* [online]. Article ID 645802. [cit. 6.5.2018], Dostupné z: DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/645802>

90. Jang MH, Choi GE, Chang ChL, Kim YD, 2011. Characteristics of Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Korea. *Korean. J Clin Microbiol.* [online]. 14(2):41–47. [cit. 5.6.2018], Dostupné z: DOI: 10.5145/KJCM.2011.14.2.41
91. Jnawali HN, Ryoo S, 2013. First- and Second-Line Drugs and Drug Resistance, Tuberculosis – Current Issues In: *Diagnosis and Management*, Mahboub BH and Vats MG, *InTech.* [online]. [cit. 20.1.2017], Dostupné z: DOI: 10.5772/54960.
92. Johnsson K, Froland WA, Schultz PG, 1997. Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis*, *J Biol Chem.* 31:272(5):2834–40
93. Joshi JM, 2011. Tuberculosis chemotherapy in the 21st century: Back to the basics. *Lung India: Official Organ of Indian Chest Society.* [online]. 28(3):193–200. [cit. 20.3.2017], Dostupné z: DOI: 10.4103/0970-2113.83977.
94. Kaiser G, 2018. The Acid-Fast Cell Wall, In: *Microbiology e-book 2018*, Biology LibreTexts Library, [online]. [cit. 25.7.2018], Dostupné z: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Kaiser\)/Unit_1%3A_Introduction_to_Microbiology_and_Prokaryotic_Cell_Anatomy/2%3A_The_Prokaryotic_Cell_-_Bacteria/2.3%3A_The_Peptidoglycan_Cell_Wall/2.3C%3A_The_Acid-Fast_Cell_Wall](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Kaiser)/Unit_1%3A_Introduction_to_Microbiology_and_Prokaryotic_Cell_Anatomy/2%3A_The_Prokaryotic_Cell_-_Bacteria/2.3%3A_The_Peptidoglycan_Cell_Wall/2.3C%3A_The_Acid-Fast_Cell_Wall)
95. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J, 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 35(4):907–914
96. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH, 2003. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol.* [online]. 94(5):781–791. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01918.x>
97. Karakousis PC, 2009. Mechanisms of Action and Resistance of Antimycobacterial Agents, In: Mayers DL (Ed.), *Antimicrobial Drug Resistance.* [online]. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 271–291 [cit. 16.5.2018], Dostupné z: DOI: 10.1007/978-1-59745-180-2_24
98. Karlson AG, Lessel EF, 1970. *Mycobacterium bovis* nom. nov., *Int J Syst Evol Microbiol.* [online]. 20/3: 273–282, [cit. 10.5.2018], Dostupné z: DOI: 10.1007/978-1-59745-180-2_24
99. Kato-Maeda M, Metcalfe JZ, Flores L, 2011. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: application in epidemiologic studies. *Future microbiology.* [online]. 6(2):203–216. [cit. 10.6.2018], Dostupné z: DOI: 10.2217/fmb.10.165.
100. Kim EY, Nahid P, Hopewell PC, Kato-Maeda M, 2010. Novel hot spot of IS6110 insertion in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* [online]. 48(4):1422–1424. [cit. 13.8.2018], Dostupné z: DOI: 10.1128/JCM.02210-09
101. Kolyva AS, Karakousis PC, 2012. Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance, In: *Understanding Tuberculosis – New Approaches to Fighting Against Drug Resistance* [online]. Edited by Cardona PJ, Chapter 9, InTech, ISBN 978-953-307-948-6 [cit. 13.4.2017], Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drug-resistance/old-and-new-tb-drugs-mechanisms-of-action-and-resistance>
102. Křepela K, Mladá J, 2008. Problematika BCG vakcinace v České republice, *Vakcinologie* 2(3): 97–104
103. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 1977;33(1):159–174
104. Lari N, Rindi L, Cristofani R, Rastogi N, Tortoli E, Garzelli C, 2009. Association of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates of BOVIS and Central Asian (CAS) genotypic lineages with extrapulmonary disease. *Clin Microbiol Infect* [online]. 15: 538–543. [cit. 28.5.2019], Dostupné z: DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02712.x>
105. Laurenzo D, Mousa SA, 2011. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic Testing. *Acta Trop.* [online]. Jul;119(1):5–10. [cit. 1.10.2018], Dostupné z: DOI: 10.1016/j.actatropica.2011.04.008.
106. Lee JY, Choi HJ, Park IN, Hong SB, Oh YM, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim DS, Kim WD, Shim TS, 2006. Comparison of two commercial interferon- γ assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J.* [online]. 28: 24–30 [cit. 27.5.2019], Dostupné z: DOI: 10.1183/09031936.06.00016906
107. Lee RS, Behr MA, 2016. The implications of whole-genome sequencing in the control of tuberculosis. *Ther Adv Infect Dis.* [online]. 3(2):47–62. [cit. 1.9.2017], Dostupné z: DOI: 10.1177/2049936115624630
108. Lomme JR, Thoen CO, Himes EM, Vinson JW, King RE, 1976. *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes, *J Am Vet Med Assoc*, Vol 169, Issue 9, 912–914,

109. Luca S, Mihaescu T, 2013. History of BCG Vaccine. *Mædica*. 8(1):53-58.
110. Machado D, Perdigão J, Ramos J, Couto I, Portugal I, Ritter C, Boettger EC, Viveiros M 2013. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with inhA double mutations, *J Antimicrob Chemother*. [online]. 68(8):1728-32. [cit. 1.12.2018], Dostupné z: DOI: 10.1093/jac/dkt090.
111. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis, 2014. Textbook of Diagnostic Microbiology – E-Book, Elsevier Health Sciences, Fourth edition, pg. 595-596, ISBN: 978-1-4160-6165-6
112. Majumder K, Wei L, Annedi CS, Kotra LP, 2007. Aminoglycoside antibiotics. In: Bonomo RA, Tolmasky ME (eds), *Enzyme-mediated resistance to antibiotics: Mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition*, 7-17. ASM Press, Washington, D.C., ISBN: 9781555813031
113. Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR, 2001. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India, *J Clin Microbiol*. [online]. 39(8):2987-90. [cit. 5.12.2018], Dostupné z: DOI: 10.1128/JCM.39.8.2987-2990.2001
114. Marques da Silva SH, da Costa MM, Lima KVB, Lima NGC, Monteiro MC, 2013. Mechanism of Resistance of Some Neglected Diseases, In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Méndez-VA, Formatex Research Center, December 2013, Vol. 1 pg 480-481, ISBN: 978-84-939843-9-7
115. Martinez E, Bustamante A, Menon R, Wang Q, Jelfs P, Marais B, Chen SCA, Sintchenko V, 2016. Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for rapid diagnostics: feasibility of a decentralised model. *Lancet Respir Med*. [online]. 4(4):13-14, [cit. 25.5.2019], Dostupné z: DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00092-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00092-8)
116. McDermott W, 1958. Microbial persistence. *Yale J. Biol. Med.* 30:257-291
117. Ministerstvo zdravotnictví České republiky (MZČR), 2019. [online]. MZČR, aktualizace leden 2019, [cit. 28.1.2019], Dostupné z: https://www.mzcr.cz/Verejne/dokumenty/seznam-statu-s-vysshim-vyskytem-tbc-aktualizace-leden-2019_16724_2465_5.html
118. Milstien JB, Gibson JJ, 1990. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. *Bulletin of the World Health Organization*. 68(1):93-108.
119. Mitchison, DA, 1984. Úvahy o chemoterapii tuberkulózy. *Čas Lék čes*, 1984, 123, s. 145-152
120. Mitchison DA, 2000. Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis, *Int J Tuberc Lung Dis*, 4(9), 796-806
121. Miyoshi-Akiyama T, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Kirikae T, 2012. Complete Annotated Genome Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman. *J Bacteriol*. [online]. 194(10):2770. [cit. 5.12.2018], Dostupné z: DOI: 10.1128/JB.00353-12
122. Mokrousov I, 2013. Insights into the Origin, Emergence, and Current Spread of a Successful Russian Clone of *Mycobacterium tuberculosis*, *Clin Microbiol Rev*. [online]. 26, 342-360, [cit. 4.10.2018], Dostupné z: DOI: 310.1128/CMR.00087-00012
123. Morales A, Eiding D, Bruce A, 1976. Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 116: 180-183
124. Mostowy S, Onipede A, Gagneux S, et al., 2004. Genomic Analysis Distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol*. [online]. 42(8):3594-3599. [cit. 5.12.2018], Dostupné z: DOI: 10.1128/JCM.42.8.3594-3599.2004
125. Mostowy S, Behr MA, 2005. The Origin and Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Chest Med* [online]. 26:207 – 216. [cit. 15.1.2018], Dostupné z: DOI: 10.1016/j.ccm.2005.02.004
126. Musser JM, 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev*. 8(4):496-514.
127. Mustafa AS, 2010. In silico binding predictions for identification of HLA-DR-promiscuous regions and epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* protein MPT64 (Rv1980c) and their recognition by human Th1 cells. *Med Princ Pract*. [online]. 9(5):367-72. [cit. 1.8.2018], Dostupné z: DOI: 10.1159/000316375.
128. Nahid P, Bliven EE, Kim EY, et al., 2010. Influence of *M. tuberculosis* Lineage Variability within a Clinical Trial for Pulmonary Tuberculosis. Marais B, ed. *PLoS ONE*. [online]. 5(5):e10753. [cit. 10.2.2018], Dostupné z: DOI: 10.1371/journal.pone.0010753.

129. Nakamura M, Harano Y, Koga T, 1990. Isolation of a strain of *M. tuberculosis* which is considered to be rifampicin-dependent, from a patient with long-lasting smear positive and culture difficult, (SPCD) mycobacteria. *Kekkaku* 65: 569-574
130. Nebenzahl-Guimaraes H, Yimer SA, Holm-Hansen C, de Beer J, Brosch R, Van Soolingen D, 2016. Genomic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 7 and a proposed name: "Aethiops vetus". *Microbial Genomics* [online]. 2:e000063. [cit. 10.4.2019], Dostupné z: DOI: 10.1099/mgen.0.000063
131. Nerurkar V, Kattungal S, Bhatia S, 2016. Utility of MPT64 antigen test for differentiating mycobacteria: Can correlation with liquid culture smear morphology add further value?. *Indian J Pathol Microbiol.* 59(2): 185-187
132. Neuschlova M, Vladarova M, Kompanikova J, Sadlonova V, Novakova E, 2017. Identification of Mycobacterium Species by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Adv Exp Med Biol.* [online]. 1021:37-42. [cit. 9.5.2019], Dostupné z: DOI: 10.1007/5584_2017_26.
133. Niemann S, Richter E, Rüscher-Gerdes S, 2002. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52(Pt 2):433-6
134. NHS National Health Service England, 2015. Collaborative tuberculosis strategy for England 2015 to 2020. Public Health England. [online]. leden 2015. [cit. 27.5.2019], Dostupné z: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/403231/Collaborative_TB_Strategy_for_England_2015_2020.pdf
135. Nor NM, Acosta A, Sarmiento ME, 2014. *The Art and Science of Tuberculosis Vaccine Development* [online]. 2nd edition, Oxford University Press (Finlay Instituto, Penerbit USM) [cit. 20.5.2016], Dostupné z: <http://tbvaccines.usm.my/>
136. Oettinger T., Jørgensen M, Ladefoged A, Hasløv K, Andersen P, 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber Lung Dis.* 79(4):243-50.
137. Orduz ML, Ribón W, 2015. Molecular Epidemiology of Tuberculosis, In: *Tuberculosis – Expanding Knowledge*, ed. Ribón W, Chapter 2 *InTech.* [online]. [cit. 25.2.2017], Dostupné z: DOI: 10.5772/59751.
138. Palomino JC, Martin A, 2014. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics* [online]. 3, 317-340, [cit. 10.2.2017], Dostupné z: DOI: 10.3390/antibiotics3030317
139. Parsons SDC, Drewe JA, Gey van Pittius NC, Warren RM, van Helden PD, 2013. Novel Cause of Tuberculosis in Meerkats, South Africa. *Emerg Infect Dis.* [online]. 19(12):2004-2007. [cit. 1.5.2017], Dostupné z: DOI: 10.3201/eid1912.130268.
140. Pavlík I, Bures F, Janovsky P, Pecinka P, Bartos M, Dvorska L, Matlova L, Kremer K, Van Soolingen D, 2002a. The last outbreak of bovine tuberculosis in cattle in the Czech Republic in 1995 was caused by *Mycobacterium bovis* subspecies *caprae*, *Vet. Med.* 47(9) 251-263
141. Pavlík I, Dvorska L, Bartos M, Parmova I, Melicharek I, Jesenska A, Havelkova M, Slosarek M, Putova I, Martin G, Erler W, Kremer K, Van Soolingen D, 2002b. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in the Czech Republic and Slovakia in the period, 1965-2001 studied by spoligotyping. *Vet. Med. – Czech*, 47, 181-194.
142. Pérez E, Constant P, Lemassu A, Laval F, Daffé M, Guilhot C, 2004. Characterization of three glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the phenolic glycolipid antigens from the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Biol Chem.* 8;279(41):42574-83
143. Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang J, 2006. Identification of Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* Jun [online]. 44 (6) 1963-1970, [cit. 27.5.2019], Dostupné z: DOI: 10.1128/JCM.01959-05
144. Ramos DF, Tavares L, Da Silva PEA, Dellagostin OA, 2014. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: A review. *Braz J Microbiol.* [online]. 45(2):657-660. [cit. 1.8.2018], Dostupné z: DOI: 10.1590/S1517-83822014005000045
145. Reed J, 1957. Genus Mycobacterium (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy), In: Breed RS, Murray EGD and Smith BR (ed): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th edition, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1957, p. 703-704

146. Reichman LB, Schaaf HS, Pontali E, Migliori GB, 2014. A new paradigm for multidrug-resistant tuberculosis?. *Int J Tuberc Lung Dis* [online]. 18(8):884 [cit. 10.2.2018], Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.14.0347>
147. Reynolds MG, 2000. Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics*, Dec; 156(4): 1471–1481
148. Rhee J T, Tanaka MM, Behr MA, Agasino CB, Paz EA, Hopewell PC, Small PM, 2000. Use of multiple markers in population-based molecular epidemiologic studies of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 4(12):1111–1119
149. Richter E, Rüschi-Gerdes S, Hillemann D, 2009. Drug-susceptibility testing in TB: current status and future prospects. *Expert Rev Respir Med*. vol. 3, issue 5, 497–510
150. Rinder H, Thomschke A, Rüschi-Gerdes S, Bretzel G, Feldmann K, Rifai M, Löscher T, 1998. Significance of *ahpC* promoter mutations for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 17(7):508–11
151. Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A, 2014. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis, *Res Vet Sci*. [online]. 97, 5–19, [cit. 15.1.2018], Dostupné z: DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.02.009
152. Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Rückert C, Nübel U, et al., 2013. Whole Genome Sequencing versus Traditional Genotyping for Investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* Outbreak: A Longitudinal Molecular Epidemiological Study. *PLOS Medicine*. [online]. 10(2): e1001387. [cit. 29.5.2019], Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001387>
153. Rozo-Anaya JC, Ribón W (2010) Molecular tools for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. *Rev Salud Publica* [online]. (Bogota) 12(3):510–21. [cit. 12.5.2018], Dostupné z: DOI: 10.1590/S0124-00642010000300016
154. Safi H, Lingaraju S, Amin A, Kim S, Jones M, Holmes M, McNeil M, Peterson SN, Chatterjee D, Fleischmann R, Alland D, 2013. Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl- β -D-arabinose biosynthetic and utilization pathway genes. *Nat Genet*. [online]. 45(10):1190–7. [cit. 12.5.2018], Dostupné z: DOI: 10.1038/ng.2743
155. Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA, 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(6):2091–2094
156. Samli A, Ilki A, 2016. Comparison of MALDI-TOF MS, nucleic acid hybridization and the MPT64 immunochromatographic test for the identification of *M. tuberculosis* and non-tuberculosis *Mycobacterium* species. *New Microbiol*. Oct;39(4):259–263
157. Sankar S, Kuppanan S, Balakrishnan B, Nandagopal B, 2011. Analysis of sequence diversity among IS6110 sequence of *Mycobacterium tuberculosis*: possible implications for PCR based detection. *Bioinformation*, 6(7), 283–285.
158. Sarkar R, Lenders L, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Nicol MP, 2012. Modern Lineages of *Mycobacterium tuberculosis* Exhibit Lineage-Specific Patterns of Growth and Cytokine Induction in Human Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE* [online]. 7(8): e43170. [cit. 10.2.2018], Dostupné z: DOI: 10.1371/journal.pone.0043170,
159. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ, 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol*. 48(1):77–84.
160. Satta G, Atzeni A, McHugh TD, 2017. *Mycobacterium tuberculosis* and whole genome sequencing: a practical guide and online tools available for the clinical microbiologist, *Clin Microbiol Infect*, 23(2), 69 – 72
161. Sekizuka T, Yamashita A, Murase Y, et al., 2015. TGS-TB: Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* Using Short-Read Whole-Genome Sequencing. Ahmed N, *PLoS ONE*. [online]. 10(11):e0142951. [cit. 1.8.2018], Dostupné z: DOI: 10.1371/journal.pone.0142951.
162. Shabbeer A, Cowan LS, Ozcaglar C, Rastogi N, Vandenberg SL, Yener B, Bennett KP, 2012. TB-Lineage: An online tool for classification and analysis of strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex *Infect Genet Evol* 12(4), 789–797
163. Schürch AC, Kremer K, Kiers A, Daviena O, Boeree MJ, Siezen RJ, Smith NH, van Soolingen D, 2010. The tempo and mode of molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis* at patient-to-patient scale. *Infect Genet Evol*. [online]. 10(1):108–114. [cit. 1.8.2018], Dostupné z: DOI: 10.1016/j.meegid.2009.10.002.
164. Schluger NW, 2008. Chemotherapy of Tuberculosis, In: *Handbook of Tuberculosis, Clinics, Diagnostics, Therapy and Epidemiology*, Kaufmann HE, van Helden P, January 2008, Wiley-Blackwell, 131–140 ISBN: 978-3-527-31888-9

165. Sebban M, Mokrousov I, Rastogi N, Sola C, 2002. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinformatics*. Feb;18(2):235-43
166. Simons SO, Mulder A, Van Ingen J, Boeree MJ, Van Soolingen D, 2013. Role of *rpsA* Gene Sequencing in Diagnosis of Pyrazinamide Resistance. *J Clin Microbiol*. [online]. 51(1):382. [cit. 10.2.2018], Dostupné z: DOI: 10.1128/JCM.02739-12
167. Smith T, 1896. Two varieties of the tubercle bacillus from mammals. *Trans Assoc Am Physicians*. 11:75-95
168. Soini H, Pan X, Amin A, Graviss EA, Siddiqui A, Musser JM, 2000. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients in Houston, Texas, by Spoligotyping. *J Clin Microbiol*. 38(2):669-676
169. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M, 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*. [online]. 2(3):164-168 [cit. 1.8.2018], Dostupné z: DOI: 10.1186/rr54
170. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN, Musser JM, 1996. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother*. 40(4):1024-1026
171. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al, 1997a. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(18):9869-9874
172. Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, et al, 1997b. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 41(8):1677-1681
173. Steenken W, Oatway WH, Petroff SA, 1934. Biological Studies of the Tubercle Bacillus: III. Dissociation and Pathogenicity of the R and S Variants of the Human Tubercle Bacillus (*H₃₇*). *J Exp Med*. 60(4):515-540
174. Sun Z, Li W, Xu S, Huang H, 2016. The discovery, function and development of the variable number tandem repeats in different *Mycobacterium* species. *Crit Rev Microbiol* 42(5):738-758
175. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, Locht C, 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39(10):3563-3571
176. Svobodová J, 2014. Vakcinační kmen *Mycobacterium bovis* BCG a očkování proti tuberkulóze. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 23(5): 182-185.
177. Svobodová J, 2013. Případy tuberkulózy v ČR v letech 2009-2012 vyvolané neobvyklými druhy komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 22(1): 12-14.
178. Svobodová J, 2018. Očkování proti tuberkulóze – historie a současnost. *Vox paediatricae* 3/2018
179. TB Profiler [online]. © 2019 London School of Hygiene and Tropical Medicine, [cit. 9.5.2019], Dostupné z: <http://tbdr.lshtm.ac.uk/>
180. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T, 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 341,647-650
181. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM, Jacobs WR Jr, 1997. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol, *Nat Med* 3(5):567-570
182. Thierry D, Brisson-Nod A, Vincent-Levy-FrWbault V, Nguyen S, Guesdon, Gicquel B, 1990a. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol*. 28:2668-2673
183. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL, 1990b. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res*. 18:188.
184. Tiberi S, Munoz-Torrico M, Duarte R, Dalcolmo M, D'Ambrosio L, Migliori GB, 2018. New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens. *Pulmonology*. [online]. 24(2):86-98. [cit. 10.2.2018], Dostupné z: DOI: 10.1016/j.rppnen.2017.10.009
185. Trčka I, Svobodová J, Bartoš M, Škořič M, Mátlová L, Franta V, Pavlík I, 2005. Případ infekce *Mycobacterium tuberculosis* u psa v České republice, *Veterinářství* 55:9-12.
186. ÚZIS (Ústav zdravotnických informací a statistiky), 2016. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2015, ÚZIS ČR 2016
187. ÚZIS (Ústav zdravotnických informací a statistiky), 2017. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2016, ÚZIS ČR 2017

188. ÚZIS (Ústav zdravotnických informací a statistiky), 2018. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2017, ÚZIS ČR 2018
189. Van Deun A, Aung KJ, Bola V, et al., 2013. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard. *J Clin Microbiol.* [online]. 51(8):2633–2640. [cit. 12.5.2018], Dostupné z: DOI: 10.1128/JCM.00553-13
190. Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM, 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology, *J. Clin. Microbiol.*, 31, 406–409
191. Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, et al., 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* [online]. [cit. 10.7.2018], Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1804.110888>
192. Van Soolingen D, Hoogenboezem T, De Haas PEW, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Gurudyal SB, Portaels F, Top J, Schouls LM, Van Embden JDA, 1997. A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa, *Int J Syst Evol Microbiol.* [online]. 47:1236–1245, [cit. 20.9.2018], Dostupné z: DOI: 10.1099/00207713-47-4-1236
193. Vargová L, Horáčková L, Langová J, 2003. Možnosti diagnostiky tuberkulózy v paleopatologických výzkumech. *Ve službách archeologie IV – Sborník k 75. narozeninám Prof. PhDr. Vladimíra Nekudy, DrSc. Muzejní a vlastivědná společnost v Brně, str. 285–293, ISBN 80-7275-041-0*
194. Vashakidze L, Salakaia A, Shubladze N, et al., 2009. Prevalence and Risk factors for Drug Resistance among Hospitalized TB Patients in Georgia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 13(9):1148–1153 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2935085/>
195. Vašáková M, Hricíková I, Kopecká E, 2016. Současný přístup k diagnostice a léčbě tuberkulózy. *Remedia* roč. 26, č. 3, s. 236–241. ISSN: 0862-8947; 236-241
196. Von Groll A, Martin A, Jureen P, et al., 2009. Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and Mutations in *gyrA* and *gyrB*. *Antimicrob Agents Chemother.* [online]. 53(10):4498–4500. [cit. 10.2.2018], Dostupné z: DOI: 10.1128/AAC.00287-09 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2764174/>
197. Vyhláška č. 299/2003 Sb., o opatřeních pro předcházení a zdoávání nálezů a nemocí přenosných ze zvířat na člověka Příl. 20
198. Wagner C, Buchanan G, Bokkenheuser V, Levisseur S, 1958. An Acid-fast Bacillus isolated from the Lungs of the Cape Hyrax, *Procavia capensis* (Pallas), *Nature* 181, 284–285
199. Wells AQ, 1937. Tuberculosis in wild voles. *Lancet.* 1:1221
200. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D, 2010. MIRU-VNTR *plus*: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res.* [online]. 38(Web Server issue):W326–W331. [cit. 23.5.2017], Dostupné z: DOI: 10.1093/nar/gkq351.
201. WHO, 2010. *Treatment of Tuberculosis: Guidelines.* [online]. 4th edition, Geneva: World Health Organization. A1, Essential first-line antituberculosis drugs. [cit. 23.5.2017], Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138747/>
202. WHO, 2011. [online]. WHO warns against the use of inaccurate blood tests for active tuberculosis (TB), 20 July 2011. [cit. 4.5.2019], Dostupné z: https://www.who.int/tb/features_archive/20july11_end_to_inaccurate_tb_blood_tests/en/
203. WHO, 2013. [online]. Definitions and reporting framework for tuberculosis. Geneva: WHO. 15 Apr 2013. [cit. 4.5.2019], Dostupné z: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79199/1/9789241505345_eng.pdf
204. WHO, 2017. [online]. *Tuberculosis.* [cit. 4.5.2019], Dostupné z: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/totally-drug-resistant-tb-faq/en/>
205. WHO, 2018. *Global tuberculosis report.* WHO ISBN 978-92-4-156564-6
206. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, et al., 2008. Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Achtman M, ed. *PLoS Pathogens.* [online]. 4(9):e1000160. [cit. 10.2.2016], Dostupné z: DOI: 10.1371/journal.ppat.1000160
207. Wollenberg KR, Desjardins CA, Zalutskaya A, et al., 2017. Whole-Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Provides Insight into the Evolution and Genetic Composition of Drug-Resistant Tuberculosis in Belarus. *J Clin Microbiol.* [online]. 55(2):457–469. [cit. 10.2.2016], Dostupné z: DOI: 10.1128/JCM.02116-16

208. Xu Y, Jia H, Huang H, Sun Z, Zhang Z, 2015. Mutations Found in *embCAB*, *embR*, and *ubiA* Genes of Ethambutol-Sensitive and -Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from China. *Biomed Res Int*. [online]. 2015;951706. [cit. 22.4.2017], Dostupné z: DOI: 10.1155/2015/951706
209. Yang H, Kruh-Garcia NA, Dobos KM, 2012. Purified protein derivatives of tuberculin -past, present, and future. *FEMS Immunol Med Microbiol*. [online]. 66(3):273-80. [cit. 20.6.2016], Dostupné z: DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.01002.x
210. Zatloukal P, Kos S, Vašáková M, 2016. Tuberkulóza dospělých. (Standard léčebného plánu) [online]. ČPFS Sekce pro tuberkulózu. [cit. 5.4.2017], Dostupné z: <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>
211. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S, 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature (London)* 358:591-593
212. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z, 2003a. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membráně transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother*, 52, 790-795
213. Zhang Y, Mitchison D, 2003b. The curious characteristics of pyrazinamide: a review, *Int J Tuberc Lung Dis*. 7(1):6-21
214. Zhang Y, Yew WW, 2009. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Int J Tuberc Lung Dis*. 13(11):1320-30
215. Zhang J, Abadia E, Refregier G, Tafaj S, Boschirolu ML, Guillard B, Andreumont A, Ruimy R, Sola C, 2010. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *J Med Microbiol* 59, 285-294
216. Zhang R, Long Y, He W, Hao X, Liu J, 2014. Application status of MALDI-TOF mass spectrometry in the identification and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Thorac Dis*. [online]. 6(5):512-516. [cit. 27.5.2019], Dostupné z: DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.02.19
217. Zhang Y, Yew WW, 2015. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015, *Int J Tuberc Lung Dis*. 19(11), 1276-1289
218. Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, Shi W, Zhang L, Wang H, Wang S, Zhao G, Zhang Y, 2008. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One* [online]. 3:e2375. [cit. 20.4.2017], Dostupné z: DOI: 10.1371/journal.pone.0002375
219. Zhong M, Zhang X, Wang Y, Zhang C, Chen G, Hu P, Li M, Zhu B, Zhang W, Zhang Y, 2010. An interesting case of rifampicin-dependent/-enhanced multidrug-resistant tuberculosis, *Int J Tuberc Lung Dis*. 14(1):40-4

Identifikace izolátů *Mycobacterium* spp. pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Autoři: J. Amlerová ; V. Študentová ; J. Hrabák

Působíště autorů: Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Plzni, Univerzita Karlova

Vyšlo v časopise: Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 63, 2014, č. 3, s. 195-198

Kategorie: Souhrnná sdělení, původní práce, kazuistiky

Klíčová slova: MALDI-TOF MS, *Mycobacterium tuberculosis*, 16S rRNA, sekvenace

Souhrn

Cíl práce: MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie je v posledních letech široce zaváděna do diagnostických mikrobiologických laboratoří. Poskytuje levnou a rychlou metodu pro taxonomickou identifikaci bakterií a mikromycet. Kromě těchto aplikací je používána i pro detekci mechanismů antibiotické rezistence. V budoucnu lze očekávat další rozšíření i pro jiné aplikace v mikrobiologii. Cílem této studie bylo validovat MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii pro identifikaci mykobakterií.

Materiál a metody: Do studie bylo zařazeno 30 izolátů *Mycobacterium* spp. izolovaných v laboratoři mykobakteriologie Fakultní nemocnice v Plzni. Druhová identifikace izolátů byla provedena biochemickými testy, genovými sondami a sekvenací genu pro 16S rRNA. Identifikace MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií probíhala s využitím extrakce pomocí silikonových kuliček. Identifikace kmene sekvenací genu pro 16S rRNA byla považována za referenční metodu.

Výsledky: Pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie byly správně identifikovány všechny izoláty *Mycobacterium* spp. (hodnota skóre 1,461 – 2,168). Jednalo se o druhy *Mycobacterium tuberculosis* (n= 5), *Mycobacterium kansasii* (n=5), *Mycobacterium avium* (n=6), *Mycobacterium intracellulare* (n=3), *Mycobacterium xenopi* (n=3), *Mycobacterium gordonae* (n=1), *Mycobacterium abscessus* (n=1), *Mycobacterium kumamotoense* (n=2), *Mycobacterium mantonii* (n=1), *Mycobacterium lentiflavum* (n=1), *Mycobacterium fortuitum* (n=1), *Mycobacterium scrofulaceum* (n=1).

Závěr: Identifikace hmotnostní spektrometrií je tedy vhodná k rutinní identifikaci *Mycobacterium* spp. v laboratořích, kde již je tato metoda zavedena pro konvenční identifikaci mikrobů.

Úvod

Česká republika patří v současné době mezi země s nízkým výskytem tuberkulózy. V roce 2012 bylo hlášeno do registru tuberkulózy 611 onemocnění tuberkulózou všech forem, lokalizací a recidiv, tj. incidence 5,8/100 000 obyvatel. Mykobakterií bylo hlášeno 108, tj. incidence 0,1/100 000 obyvatel. Jako příčina mykobakterií bylo identifikováno *M. avium* komplex (52 případů), *M. xenopi* (21) a

M. kansasii (19) [1]. Přes tyto velmi příznivé údaje zůstává problematika tuberkulózy a onemocnění způsobených mykobakteriemi jiných druhů než *Mycobacterium tuberculosis* komplex (MOTT) stále aktuální. Tuberkulózní pacient představuje významné epidemiologické riziko, mykobakterií nabyvají význam u imunokompromitovaných nemocných [2]. Zásadní součástí diagnostiky těchto onemocnění je laboratorní průkaz agens, identifikace kmene a stanovení citlivosti k antituberkulotikům.

Identifikace mykobakteriálních izolátů prodělala v poslední době velký vývoj. Klasické konvenční metody identifikace – morfologie, pigmentace, biochemické a další testy mají v diagnostice stále svoje nezastupitelné místo. Genetické metody hybridizační i amplifikační našly široké uplatnění pro svoji specifitu a senzitivitu a při použití komerčních souprav i pro svoje poměrně snadné provedení [3]. Při identifikaci vzácných nebo „problematických“ druhů je s dobrým úspěchem používána sekvenace genu pro 16S ribozomální RNA a následné porovnání sekvencí nukleotidů s databází NCBI (National Center for Biotechnology Information) [4]. V poslední době jsou zaváděny další metody, principiálně odlišné. Jednou z těchto metod je hmotnostní spektrometrie [5].

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která umožní stanovit molekulovou hmotnost studovaných látek ve velkém rozsahu (cca. 50 – >50 000). V mikrobiologické diagnostice se využívá systém MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS) [6].

Ionizace molekul ve vzorku probíhá pomocí laseru za přítomnosti matrice. V klinické mikrobiologii je tento systém využíván k identifikaci bakteriálních izolátů, dále k identifikaci kvasinek a vláknitých hub. Nově jsou zaváděny aplikace k detekci antibiotické rezistence [7]. Nabízí se také možnost použití pro identifikaci mykobakterií, zejména tam, kde je vhodné co nejširší využití tohoto přístrojového vybavení [8,9]

Materiál a metody

Izoláty *Mycobacterium* spp.

Do studie bylo zařazeno 30 izolátů rodu *Mycobacterium* spp. deponovaných na Ústavu mikrobiologie LF UK v Plzni a FN Plzeň (viz tabulka 1). Vzorky byly uchovány v kryozkumavkách (ITEST Plus, Hradec Králové, Česká republika) a očkované na pevné vaječné půdy (Löwenstein-Jensen a Ogawa; TRIOS, Olomouc, Česká republika) a do tekutého média (Middlebrook 7H12B) v lahvičkách pro detekční systém BACTEC® MGIT™ 960.

Identifikace klasickými metodami

Mezi konvenční metody identifikace byly zahrnuty mikroskopická morfologie, makroskopická morfologie, pigmentace, test fotochromogenity, růst v různých teplotách, biochemické testy (produkce niacinu, redukce nitrátu, citlivost na hydrazid kyseliny thiofen-2-karbonové (TCH), hydrolýza Tweenu 80, průkaz arylsulfatázy, průkaz kyselý fosfatázy) [11].

Identifikace pomocí genových sond

Identifikace byla provedena dle návodu výrobce (genové sondy – GenProbe, San Diego, CA, USA). Genové sondy byly použity pouze pro dostupné druhy – komplex *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* a *M. gordonae*.

Identifikace pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA

Mykobakteriální izoláty byly inaktivovány teplem (95 °C, 10 min). DNA byla izolována kitem PathogenFree DNA Isolation Kit (GeneProof, Brno, Česká republika). PCR amplifikace genu pro 16S rRNA a sekvenace PCR produktů byla provedena dle Marchesi *et al.* [10]. Výsledné sekvence byly srovnány s databází GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Pro identifikaci metodou MALDI-TOF MS byl použit postup doporučovaný výrobcem (Bruker Daltonik, Brémy, Německo). Byla použita 1 plná klička kmene z pevné vaječné půdy nebo 1 ml suspenze z tekuté půdy. Kultura byla inaktivována pomocí 1 ml 75% ethanolu s následnou centrifugací 5 min při 12 000×g. Peleta byla resuspendována v 500 µl sterilní destilované vody, směs byla centrifugována (5 min při 12 000×g) a výsledná peleta byla resuspendována v 50 µl sterilní destilované vody. Vzorky byly inkubovány 30 minut při 95 °C. K inaktivovaným vzorkům bylo přidáno 1,2 ml vychlazeného ethanolu (-20 °C), peleta byla vysušena při otevřené zkumavce při 35 °C (cca 10 minut). Následně byla suchá peleta resuspendována v 50 µl acetonitrilu. Poté bylo přidáno malé množství silikonových kuliček (průměru 0,5 mm) a intenzivně vortexováno po dobu 1 min. Po promíchání bylo přidáno 50 µl 70% kyseliny mravenčí a ihned centrifugováno (5 min při 12 000×g). 1 µl supernatantu byl nanesen na destičku pro hmotnostní spektrometrii a po usušení byl převrstven 1 µl matrice (roztok kyseliny skořicové). Naměřená spektra byla vyhodnocena pomocí MALDI Biotyper, verze 3.0 s databází Mycobacteria Library 1.0 (bead method).

Interpretace výsledků byla provedena podle hodnotových skóre a srovnáním pravděpodobnosti pořadí jednotlivých identifikovaných druhů.

Výsledky a diskuse

Výsledky identifikací u jednotlivých izolátů a různých metod jsou uvedeny v tabulce č. 2. Kromě druhů *Mycobacterium tuberculosis* komplex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* a *M. gordonae* se podařilo identifikovat i druhy, které nebylo možné určit biochemickými testy nebo genovou sondou (*M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. kumamotonense*, *M. mantonii*, *M. lentiflavum*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*).

Hodnocení výsledků MALDI-TOF MS probíhalo v souladu s doporučením výrobce podle hodnotových skóre (viz tab. 3). Výsledky byly interpretovány v souvislosti s dalšími vlastnostmi izolátů a s hodnocení kvality spektra (charakter jednotlivých vrcholů spektra). Zásadní pro identifikace metodou MALDI-TOF MS se ukázala příprava izolátů. Bylo potřeba dostatečné množství

mykobakteriální kultury. Druh kultivační půdy (vaječné nebo tekuté) neměl na kvalitu výsledných spekter vliv. Je nutné přesné dodržení množství reagensů a reakčních časů. Klíčovým problémem se ukázal druh silikonových kuliček, které při přípravě vzorku slouží jako inertní mechanický prostředek k narušení buněk. Při použití doporučeného druhu o průměru 0,5 mm byla lýza kultury dostatečná a získaná spektra kvalitní pro provedení identifikace. Další důležitou fází přípravy je úplné vysušení pelety před přidáním acetonitrilu. Vlastní měření spekter probíhalo až na výjimky manuálně s výběrem vhodných míst pro měření na pozici terčíku.

Srovnáním s identifikací pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA se identifikace metodou MALDI-TOF MS ukázala být velmi spolehlivá, srovnatelná s ostatními, molekulárně-genetickými metodami. Přestože byly skóre u některých izolátů nižší, než doporučuje výrobce, bylo možné identifikaci uzavřít v kontextu s ostatními výsledky (např. pořadí a pravděpodobnost identifikovaných druhů) a ostatními diagnostickými znaky (např. morfologie kolonií). V případě nižších hodnot identifikačního skóre je nutné výsledky MALDI-TOF MS identifikace hodnotit vždy v kontextu s ostatními identifikačními technikami (morfologie kolonií, biochemické testy atp.). Výhodou této metody je bezesporu možnost identifikovat izoláty i jednotlivě, bez rizika expirace diagnostických kitů. Časová náročnost je nízká (cca 2 hod). Materiálové náklady na vyšetření jednoho vzorku se pohybují cca 30 Kč (cena reagensů). Cenové náklady na přístrojové vybavení jsou ovšem vysoké. Proto je tato metoda vhodná zejména na pracovištích, která mají MALDI-TOF MS analyzátor již k dispozici i k jiným účelům.

Identifikace pomocí sekvenace genu pro 16S ribozomální RNA je metodou vysoce spolehlivou, ale velmi ekonomicky i časově nákladnou. Proto na většině pracovišť zůstává jako metoda specializovaná pro případy, kdy jednodušší metody selhávají.

Závěr

Identifikace *Mycobacterium* spp. pomocí MALDI-TOF MS „klasickou“ extrakční metodou s využitím kyseliny mravenčí selhává. Výsledná spektra nejsou vhodná pro identifikaci. K rozrušení buněk je nezbytně nutné využít metodu se silikonovými kuličkami, které umožní optimální extrakci ribosomálních proteinů. Nezbytnou pro identifikaci je i využití speciální databáze určené pro *Mycobacterium* spp. V této konfiguraci lze dosáhnout výsledky srovnatelné se sekvenací genu pro 16S rRNA. MALDI-TOF MS je tedy spolehlivou metodou pro identifikaci *Mycobacterium* spp. využitelnou v rutinních diagnostických laboratořích i referenčních centrech.

Poděkování

Práce byla podpořena projektem PRVOUK P36 – Náhrada, podpora a regenerace funkce některých životně důležitých tkání a orgánů.

Tabulka č. 1 – Druhy klinického materiálu

Druh materiálu	Počet
Sputum	23
BAL	5
Tkáň plicní	1
Sekret z píštěle	1

Tabulka č. 2 – Výsledky identifikace (ID)

Vz. číslo	ID rutinní		ID sekvenací	ID MALDI-TOF MS	Hodn. skóre
	Konvenční	genová sonda			
1	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis komplex</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis komplex</i>	1,804
2	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis komplex</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis komplex</i>	1,903
3	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis komplex</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis komplex</i>	1,973
4	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis komplex</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis komplex</i>	2,109
5	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis komplex</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis komplex</i>	1,904
6	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	1,588
7	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	1,924
8	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	2,123
9	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	2,155
10	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	2,164
11	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium ssp. avium</i>	1,719
12	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	2,067
13	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	1,555
14	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	1,987
15	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	1,997
16	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	1,839
17	<i>M. intarcelullare</i>	<i>M. intarcelullare</i>	<i>M. intarcelullare</i>	<i>M. intarcelullare</i>	1,988
18	<i>M. intarcelullare</i>	<i>M. intarcelullare</i>	<i>M. intarcelullare</i>	<i>M. intarcelullare</i>	1,852
19	<i>M. intarcelullare</i>	<i>M. intarcelullare</i>	<i>M. intarcelullare</i>	<i>M. intarcelullare</i>	1,461
20	<i>M. xenopi</i>	neprovedeno	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	1,598
21	<i>M. xenopi</i>	neprovedeno	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	1,950
22	<i>M. xenopi</i>	neprovedeno	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	1,936
23	<i>M. gordonae</i>	neprovedeno	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	2,119
24	<i>M. abscessus</i>	neprovedeno	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2,074
25	Neurčeno	neprovedeno	<i>M. kumamotoense</i>	<i>M. kumamotoense</i>	1,797
26	Neurčeno	neprovedeno	<i>M. mantonii</i>	<i>M. mantonii</i>	2,168
27	<i>M. lentiflavum</i>	neprovedeno	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	1,954
28	<i>M. terrae</i>	neprovedeno	<i>M. kumamotoense</i>	<i>M. kumamotoense</i>	2,111

Vz. číslo	ID rutinní		ID sekvenací	ID MALDI-TOF MS	Hodn. skóre
	Konvenční	genová sonda			
			se		
29	<i>M. fortuitum</i>	neprovedeno	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	2,049
30	<i>M. scrofulaceum</i>	neprovedeno	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	1,630

Tabulka č. 3 – Význam hodnot skóre výsledku metody MALDI-TOF MS

Rozsah	Popis
2,300 – 3,000	Druh byl s vysokou pravděpodobností identifikován
2,000 – 2,299	Rod identifikován s jistotou, druh pravděpodobně
1,700 – 1,999	Pravděpodobná identifikace rodu
0,000 – 1,699	Nespolehlivá identifikace

Literatura

1. Ústav zdravotnických informací. *Tuberkulóza a respirační nemoci 2012*. Praha: ÚZIS, 2013. Dostupná na <http://www.uzis.cz>.
2. Tortoli, E., Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect.*, 2009, roč. 15, s. 906-910.
3. Drobniewski, F.A, Caws, M., Gibson, A., Young, D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.*, 2003, roč. 3, s. 141-147.
4. Slany, M., Pavlik, I. Molecular detection of nontuberculous mycobacteria: advantages and limits of a broad-range sequencing approach. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, roč. 22, s. 268-276.
5. Seng, P., et al. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.*, 2010, roč. 5, s. 1733-1754
6. Shah, H.N., Gharbia, S.E. *Mass Spectrometry for Microbial Proteomics*, Londýn: Wiley, 2010, ISBN: 978-0-470-68199-2.
7. Hrabák, J., Chudackova, E., Walkova, R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *Clin Microb Rev.*, 2013, roč. 26, s. 103–114.
8. Saleeb, P.G., Drake, S.K., Murray, P.R., Zelazny, A.M. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.*, 2011, roč. 49, s. 1790–1794.
9. Lotz, A., 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, roč. 48, s. 4481-4486.
10. Marchesi, J.R., et al. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, roč. 64, s. 795 – 799.
11. Havelková, M., et al. *Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí*. 1. vyd. Praha: SZÚ Praha ve spolupráci s firmou Trios s.r.o., 1998.

Clin Microbiol Infect. 2018 Jun;24(6):599-603. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.012. Epub 2017 Nov 22.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.012>

How to: identify non-tuberculous *Mycobacterium* species using MALDI-TOF mass spectrometry

F. Alcaide¹, J. Amlerova², G. Bou³, P.J. Ceysens⁴, P. Coll⁵, D. Corcoran⁶, M.-S. Fangous⁷, I. Gonzalez-Alvarez⁸, R. Gorton⁹, G. Greub^{10, 11}, G. Hery-Arnaud⁷, J. Hrabak², A. Ingebretsen¹², B. Lucey¹³, I. Marekovic¹⁴, C. Mediavilla-Gradolph¹⁵, M.R. Monte¹⁶, J. O'Connor¹³, J. O'Mahony¹³, O. Opota¹⁰, B. O'Reilly⁶, D. Orth-Holler¹⁷, M. Oviano³, J.J. Palacios⁸, B. Palop¹⁵, A.B. Pranada¹⁸, L. Quiroga¹⁹, D. Rodríguez-Temporal¹, M.J. Ruiz-Serrano^{11, 19, 20}, G. Tundo¹⁶, A. Van den Bossche⁴, J. van Ingen²¹, B. Rodriguez-Sanchez^{11, 19, 20, *}, on behalf of European Study Group on Genomics and Molecular Diagnosis (ESGMD).

¹Servei de Microbiologia, Hospital Universitari de Bellvitge- IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ²Biomedical Center, Faculty of Medicine in Plzen, Plzen, Czech Republic; ³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain; ⁴Division of Bacterial Diseases, Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium; ⁵Hospital Sant Pau i Santa Creu, Servei de Microbiologia, Barcelona, Spain; ⁶Laboratory of Medicine, Diagnostic Directorate, Cork University Hospital, Bishopstown, Cork, Ireland; ⁷Laboratoire de Bactériologie, Plateforme de Biologie, Hôpital Cavale Blanche, Brest, France; ⁸Unidad Referencia Regional de Micobacterias, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; ⁹Health Services Laboratories, London, UK; ¹⁰Institut de Microbiologie de l'Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland; ¹¹European Study Group on Genomics and Molecular Diagnosis (ESGMD), Switzerland; ¹²Dept. of Microbiology, Oslo University Hospital, Oslo, Norway; ¹³Department of Biological Sciences, Cork Institute of Technology, Ireland; ¹⁴University of Zagreb School of Medicine, University Hospital Centre Zagreb, Department of Clinical and Molecular Microbiology, Zagreb, Croatia; ¹⁵Laboratorio de Microbiología, Hospital Regional de Málaga, Málaga, Spain; ¹⁶Laboratori de Microbiologia-CDB, Hospital Clínic de Barcelona-ISGlobal, Departament de Fonaments Clínics, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Spain; ¹⁷Division of Hygiene and Medical Microbiology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria; ¹⁸MVZ Dr. Eberhard & Partner Dortmund (ÜBAG), Department of Medical Microbiology, Dortmund, Germany; ¹⁹Clinical Microbiology and Infectious Diseases Department, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ²⁰CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES CBo6/o6/0058), Madrid, Spain; ²¹Department of Medical Microbiology, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands; *Corresponding author.

Accepted 14 November 2017; Available online xxx; Editor: L Leibovici

Keywords: Identification – MALDI-TOF MS – Non-tuberculous mycobacteria – Procedure – Sample preparation

Abstract

Background: The implementation of MALDI-TOF MS for microorganism identification has changed the routine of the microbiology laboratories as we knew it. Most microorganisms can now be reliably identified within minutes using this inexpensive, user-friendly methodology. However, its application in the identification of mycobacteria isolates has been hampered by the structure of their cell wall. Improvements in the sample processing method and in the available database have proved key factors for the rapid and reliable identification of non-tuberculous mycobacteria isolates using MALDI-TOF MS.

Aims: The main objective is to provide information about the proceedings for the identification of nontuberculous isolates using MALDI-TOF MS and to review different sample processing methods, available databases, and the interpretation of the results.

Sources: Results from relevant studies on the use of the available MALDI-TOF MS instruments, the implementation of innovative sample processing methods, or the implementation of improved databases are discussed.

Content: Insight about the methodology required for reliable identification of non-tuberculous mycobacteria and its implementation in the microbiology laboratory routine is provided.

Implications: Microbiology laboratories where MALDI-TOF MS is available can benefit from its capacity to identify most clinically interesting non-tuberculous mycobacteria in a rapid, reliable, and inexpensive manner.

Background

The genus *Mycobacterium* comprises *Mycobacterium tuberculosis*, a major worldwide public health threat [1] and an increasing number of non-tuberculous mycobacteria (NTM) species which are commonly found in water and other environmental sources, [2-4]. Their common presence in man-made water systems results mainly from their co-occurrence with free-living amoebae that are used as a replicative niche and widespread reservoir [5]. Almost one-third of the 186 NTM species described today (<http://www.bacterio.net/>) have been associated with infections in humans, such as pulmonary infections, lymphadenitis in children, skin diseases, and disseminated infections in immunocompromised patients [6-9]. Since 2015, several cases of infections after cardiosurgical intervention in Western countries have been associated with *Mycobacterium chimaera* present in heater/cooler devices used for extracorporeal cardiopulmonary support [10,11].

As a consequence, the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America (ATS/IDSA) recommend the assignment of species-level identification of NTM isolates from clinical specimens to establish clinical significance [12].

In the last decade we have witnessed how MALDI-TOF MS has become a reliable tool for NTM identification [13-24] because of (i) the development of several extraction methods that enhance the amount of bacterial proteins available for MALDI-TOF MS identification, and (ii) the increasing number of mycobacterial spectra in commercial databases. On the Bruker Daltonics platform (Bremen, Germany), the database version 3.0 has been a great advance (regarding its predecessor) and it included as many as 853 spectra from 149 different *Mycobacterium* species [21,23]. The latest released version (Mycobacteria Library v5.0) represents a further slight improvement with a total of 912 spectra from 159 *Mycobacterium* species. The NTM species still lacking in the most updated versions of the Mycobacteria Library (Bruker Daltonics) are listed in Table 1.

Similarly, the Saramis v4.12 RUO library (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) contains 1286 spectra from 45 *Mycobacterium* species. Both systems use different algorithms for the identification of microbial protein spectra but have been shown to perform similarly for NTM identification [13,14]. Recently, the IVD 3.0 version (VITEK MS, bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) has also been released, providing robust identification of *Mycobacterium* isolates both from solid and liquid cultures [25].

As a result of these important improvements, MALDI-TOF MS technology has been implemented for routine identification of NTM in many laboratories and has been shown to perform similarly to conventional methods (DNA amplification-hybridization with species-specific probes) [13-24]. This technique has achieved up to 98% agreement with 16S rRNA, hsp65 and rpoB genes sequencing.

It is important to remark that MALDI-TOF MS performance for species belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) allows only complex-level identification.

Biosafety issues

The recommendation of global advisory bodies such as the Centres for Disease Control and Prevention (CDC) is to apply Biosafety Level 2 (BSL₂) measures for the manipulation of NTM isolates (https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl5_sect_viii.pdf). However, BSL₃ is recommended when the simultaneous presence of NTM and MTBC isolates in the same sample cannot be ruled out. Samples are to be handled in BSL₃ during the first steps of the sample processing protocol, until they are heat-inactivated. Incubation of a small amount of bacteria in 70% ethanol has also been demonstrated as a safe way to render both MTB and NTM isolates nonviable [19].

Sample preparation

The main goal of the procedure is to break the cell wall using chemical and mechanical methods and to extract the bacterial proteins using formic acid and acetonitrile. Physical disruption of the cells is achieved using sonication, bead beating, or vortexing in the presence of silica beads (Fig. 1).

The protocol starts from a 1 μ L loopful of bacterial biomass which is gently resuspended in 300 μ L distilled water. Bacteria are heat-inactivated in a dry water bath at 95°C for 30 minutes and submerged in ethanol to a final concentration of 75%. At this point, many research groups report minor variations for cell disruption and protein extraction (Fig. 1).

Sonication protocol

The protocol based on sonication continues by centrifuging the sample at maximal speed and removing ethanol thoroughly, including a second centrifugation step if required. The pellet must be then dried to evaporate the rest of the ethanol. Total removal of ethanol is important to obtain high-quality protein spectra. Acetonitrile and 0.5 mm zirconia/silica or glass beads are added (Biospec - www.biospec.com- and Thistle Scientific, Glasgow, UK) and the mix is vortexed for 5 seconds followed by a 15-minute sonication step in a simple water bath sonicator with only one sonication intensity (Mechanical Ultrasonic Cleaning Bath, Thermo Fisher, Waltham, USA or equivalent). Next, 70% formic acid is added at 1:1 vol/vol. Tubes are vortexed again for 10 seconds and centrifuged for 2 minutes at maximal speed. One microlitre of supernatant is spotted on the MALDI target microplate, allowed to dry and covered with 1 μ L of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) prepared following the manufacturer's instructions. Once dried, the sample is ready to be analysed by MALDI-TOF MS [22].

Bead-beating protocol

Alternatively, the bead-beating protocol [24] may be used to improve the mechanical rupture of the bacterial cell walls. Practically, the bacteria are beaten with zirconia/silica beads suspended in 70% ethanol. Afterwards, the suspension is transferred to a clean tube where a protein extraction step with formic acid and acetonitrile is performed (Fig. 1).

MycoEX protocol

The procedures proposed by MALDI-TOF MS manufacturers are similar, with the MycoEX protocol [17] consisting of a 1-minute vortex in the presence of acetonitrile and zirconia/silica beads. For the Vitek MS system (bioMérieux), similar sample processing has been reported (suspension in ethanol followed by mechanical disruption using silica beads and a protein extraction step) [25,26]. Once the samples have been inactivated, the turnaround time for the sonication, bead-beating, and MycoEX protocol is 40, 45 and 30 minutes, respectively.

It is important to note that bioMerieux have standardized the pretreatment of *Mycobacterium* / *Nocardia* and moulds through reagent kits (bioMerieux). An interlaboratory evaluation of these sample preparation methods was recently performed and is described in the following section.

Preliminary studies that evaluated MALDI-TOF MS for NTM identification showed discrepancies according to the type of culture medium. Whereas the performances were reliable for NTM isolates cultured on solid medium, deficiencies in the method were observed for liquid medium culture [27,28]. Updated protocols for sample preparation from liquid medium describe taking 1-2 mL from the bottom of the tube, where the liquid medium is turbid and centrifuged at maximal speed in an Eppendorf tube. Where the biomass appears to be less than 10mL, a second aliquot of the mycobacterial biomass is extracted and centrifuged. The pellet is then processed as explained above for solid cultures.

These improvements in sample processing methods and in the availability of updated databases have allowed the identification of NTM with a similar level of confidence to that obtained from solid cultures [14,26,29]. These results support the feasibility of implementing the MALDI-TOF MS in the workflow for NTM identification in routine.

MALDI-TOF analysis

Several features of the *Mycobacterium* genus, such as the thickness of their cell wall, the lower number of ribosomes and ribosomal proteins compared with other bacteria, or their low growth rate have rendered these microorganisms particularly challenging for MALDI-TOF MS. Therefore, for the Bruker system the score value accepted for 'high confidence identification' has been established at 1.8 instead of 2.0 and the cut-off value for 'low confidence identification' at 1.6 instead of 1.7 [21]. For the Vitek MS system, the cut-off for reliable species-level identification has been established at >90%, although score values between 80% and 90% are accepted. Results between 60% and 80% are considered as 'low confidence' results and might be consistent only at genus level, while those below 60% are considered as 'not reliable' identifications [30].

For both systems, analysis of NTM isolates in duplicates or triplicates is recommended. When the results from the different spots are consistent and display a score 1.8 for the Bruker system or >85% with the Vitek MS instrument, they can be considered as 'high confidence' results and can be reliably transmitted to the clinicians. However, when the results from different spots are only consistent at the genus level, that is when the score value is <1.6 for the Bruker system or below 60% for the Vitek MS system, the results should be handled with caution, although a high correlation with DNA sequencing identification has been reported [14,17]. In such situations, the recommended way to proceed is to spot again the protein extraction from the NTM isolate in two to three positions and repeat MALDI-TOF MS analysis or inactivate a fresh loopful of biomass and repeat the whole procedure from scratch. Successful identification rates at the species level are reported to range

between 80% and 98% in most studies [13-26]. Besides, the high quality of the peaks obtained allows the discrimination of closely related species. For this purpose, it is also important to mention that in-house libraries can be built with local and reference strains using a simple proceeding developed by the manufacturers. Thus, the number of isolates that require other molecular methods for a final identification is continuously decreasing.

Recently, a multicentre study has been carried out [31] for comparison of the three sample processing protocols described in this article. Results from 12 NTM isolates tested in 14 different laboratories showed that the three protocols yielded above 89% correct species level identifications with log (score) values above 2.0. The sonication protocol provided accurate species assignment of 98% of the analysed isolates and no misidentifications. It is worth mentioning that the misidentifications detected with the other protocols always involved closely related species and they would have not led to a different therapy for the patient.

Finally, a recent paper from Pranada et al. [32] has reported the differentiation of closely related NTM species such as *M. chimaera* and *Mycobacterium intracellulare* by detecting the presence of species-specific protein peaks. This shows the high capacity of MALDI-TOF MS for NTM species discrimination and its value to differentiate between invasive infection and environmental colonization, along with the clinical evaluation of the patient.

Despite all the above-mentioned advantages of MALDI-TOF MS, the (sub)species comprised within the MTBC currently cannot be differentiated and are only identified at complex level. Besides, further studies are required using clinical NTM isolates to assess the performance of MALDI-TOF MS in routine samples.

Quality control

Internal quality control for MALDI-TOF MS in general bacteriology is in part achieved using Bacterial Test Standard (BTS, Bruker Daltonics), consisting of an extract of *Escherichia coli* proteins for the calibration of the instrument. For the NTM, given their specific extraction procedure, a control strain to assess the performance of the extraction is important but has not been yet standardized. One option would be to use a strain also in use in quality controls of NTM susceptibility testing (*Mycobacterium peregrinum* ATCC 700686 and/or *Mycobacterium avium* ATCC 700898), as these strains are already present in many mycobacteriology reference laboratories. Otherwise, international agreement on, and Exchange of, control strains might also be considered as an option.

External quality control, that is blinded interlaboratory Exchange of well-identified isolates, is important to benchmark performance of individual laboratories using this technique. International organizations such as ESCMID/ESGMYC or NTM-NET (www.ntm-net.org) are good candidates to organize and coordinate external quality assurance.

Transparency declaration

The authors have nothing to disclose. BR-S (CPI14/00220) is a recipient of a Miguel Servet contract supported by the Health Research Fund (FIS) of the Carlos III Health Institute (ISCIII), Madrid, Spain, partially financed by the by the European Regional Development Fund (FEDER).

Acknowledgements

All the authors are members of the EU Myco MALDI project. They have participated in the implementation of MALDI-TOF MS for mycobacteria identification. F. Alcaide, P. J. Ceyskens, M. S. Fangous, G. Hery-Arnaud, J. Hrabak, A. Ingebretsen, I. Marekovic, J. O'Connor, O. Opota, D. Orth-Höller, M. Ovia~no, J. J. Palacios, A. Pranada, D. Rodríguez-Temporal, M. J. Ruiz-Serrano, G. Tudo, J. van Ingen, and B. Rodríguez-Sanchez actively participated in writing and reviewing the manuscript.

References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_executive_summary.pdf.
2. Falkinham 3rd JO. Ecology of nontuberculous mycobacteriae – where do human infections come from? *Semin Respir Crit Care Med* 2013;34:95e102.
3. Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:2428e38.
4. Corsaro D, Pages GS, Catalan V, Loret JF, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *Int J Hyg Environ Health* 2010;213:158e66.
5. Loret JF, Greub G. Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health* 2010;213:167e75.
6. Wayne LG, Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:1e25.
7. McGrath EE, Anderson PB. Increased prevalence of non-tuberculous mycobacteria infection. *Lancet* 2007 Jul 7;370(9581):28.
8. Adekambi T. *Mycobacterium mucogenicum* group infections: a review. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:911e8.
9. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:727e52.
10. Svensson Erik, Jensen Elsebeth Tvenstrup, Rasmussen Erik Michael, Folkvardsen Dorte Bek, Norman Anders, Lillebaek Troels. *Mycobacterium chimaera* in heaterecooler units in Denmark related to isolates from the United States and United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2017;23:507e9.
11. Sommerstein Rami, Rüegg Christian, Kohler Philipp, Bloemberg Guido, Kuster Stefan P, Sax Hugo. Transmission of *Mycobacterium chimaera* from heaterecooler units during cardiac surgery despite an ultraclean air ventilation system. *Emerg Infect Dis* 2016;22:1008e13.
12. 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 nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2007;175:367e416.
13. Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol* 2014;52:130e8.
14. Buchan BW, Riebe KM, Timke M, Kostrzewa M, Ledebøer NA. Comparison of MALDI-TOF MS with HPLC and nucleic acid sequencing for the identification of *Mycobacterium* species in cultures using solid medium and broth. *Am J Clin Pathol* 2014;141:25e34.

15. Amlerova J, Studentova V, Hrabak J. Identification of *Mycobacterium* spp. isolates using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 2014;63:196e9.
16. Tudo G, Monte MR, Vergara A, Lopez A, Hurtado JC, Ferrer-Navarro M, et al. Implementation of MALDI-TOF MS technology for the identification of clinical isolates of *Mycobacterium* spp. in mycobacterial diagnosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:1527e32.
17. Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Marín M, Lopez Roa P, Rodríguez- Creixems M, Bouza E. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nontuberculous mycobacteria from clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2015;53: 2737e40.
18. Mediavilla-Gradolph MC, De Toro-Peinado I, Bermúdez-Ruiz MP, García- Martínez Mde L, Ortega-Torres M, Montiel Quezel-Guerraz N, et al. Use of MALDI-TOF MS for identification of nontuberculous mycobacterium species isolated from clinical specimens. *Biomed Res Int* 2015:854078.
19. Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, Lucas BC, Rodning AA, Walchak RC, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of mycobacterium species, nocardia species, and other aerobic actinomycetes. *J Clin Microbiol* 2016;54:376e84.
20. Marekovic I, Bosnjak Z, Jakopovic M, Boras Z, Jankovic M, Popovic, Grle S. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in identification of nontuberculous mycobacteria. *Chemotherapy* 2016;61:167e70.
21. Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Ruiz A, Timke M, Kostrzewa M, Bouza E. Evaluation of MALDI biotyper mycobacteria library v3.0 for identification of nontuberculous mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2016;54:1144e7.
22. O'Connor JA, Lynch-Healy M, Corcoran D, O'Reilly B, O'Mahony J, Lucey B. Improved matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based identification of mycobacterium spp. By use of a novel two-step cell disruption preparatory 399 technique. *J Clin Microbiol* 2016;54:495e6.
23. Rodríguez-Temporal D, Perez-Risco D, Struzka EA, Mas M, Alcaide F. Impact of updating the MALDI-TOF MS database on the identification of nontuberculous mycobacteria. *J Mass Spectr* 2017;52:597e602.
24. Ceyskens PJ, Soetaert K, Timke M, Van den Bossche A, Sparbier K, De Cremer K, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for combined species identification and drug sensitivity testing in mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2017;55:624e34.
25. Leyer C, Gregorowicz G, Mougari F, Raskine L, Cambau E, de Briel D. Comparison of Saramis 4.12 and IVD 3.0 Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of mycobacteria from solid and liquid culture media. *J Clin Microbiol* 2017;55:2045e54.
26. Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2013;51: 2875e9.
27. Fangous MS, Lasserre C, Beuruelle C, Bezeaux C, Tand_e D, Hery-Arnaud G. Implementation of MALDI-TOF mass spectrometry in the laboratory workflow for non tuberculous mycobacteria diagnosis in routine at the CHRU of Brest (French). France (Paris): 33e Reunion Interdisciplinaire de Chimiotherapie Anti Infectieuse (RICAI); 21e22 November 2013.
28. van Eck K, Faro D, Wattenberg M, de Jong A, Kuipers S, van Ingen J. Matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry fails to identify nontuberculous mycobacteria from primary cultures of respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2016;54:1915e7.
29. Fangous MS, Dipoko S, Chalon J, Le Bris M, Garin S, Hery-Arnaud GA. 3y-report after implementation of MALDI-TOF mass spectrometry in the laboratory workflow for non tuberculous mycobacteria diagnosis in routine at the CHRU of Brest (French). France (Paris): 36e Reunion Interdisciplinaire de Chimiotherapie Anti Infectieuse (RICAI); December 2016. p. 12e3.
30. Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012;50:1313e25.
31. Simon M, Alcaide F, Amlerova J, Bou G, Coll P, Fangous MS, et al. Multicenter study on the improved identification of non-tuberculous mycobacteria with MALDI-TOF using three different preprocessing protocols. In: Poster Poo85. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna (Austria); 22-25 April 2017.

32. Pranada AB, Witt E, Bienia M, Kostrzewa M, Timke M. Accurate differentiation of *Mycobacterium chimaera* from *Mycobacterium intracellulare* by MALDI-TOF MS analysis. J Med Microbiol 2017;66:670e7.

Figure legend:

Fig. 1 – Schematic NTM sample processing for MALDI-TOF MS identification. Modified from O'Connor et al., 2006. *The bead-beating protocol continues from this step. **Zirconia/Silica can be replaced by glass beads.

1. **Mycobacterial biomass resuspended gently in 300 µl dH2O**
2. **Heat-inactivation at 95°C for 30 minutes**
3. **Addition of ethanol to 75%***
4. **Centrifugation and thorough removal of ethanol**
5. **Allow the pellet to dry**
6. **Addition of 10-50 µl of acetonitrile and 10µl of 0.5mm Zirconia/Silica beads****

<u>SONICATION</u>	<u>MycoEX</u>	<u>BEAD-BEATING</u>
I. Vortex for 5s	I. Vortex for 1 min	I. Add 10 µl of Zirconia/Silica beads**
II. Sonicate for 15 min	II. Add 10-50 µl 70% Formic Acid	II. Bead-beat for 1 min
III. Add 10-50 µl 70% Formic Acid	III. Vortex for 10 s	III. Transfer the liquid to a clean tube
IV. Vortex for 10 s	IV. Centrifuge at max speed for 2 min	IV. Centrifuge at max speed
V. Centrifuge at max speed for 2 min	V. Pipette 1 µl of supernatant onto the MALDI target	V. Remove the supernatant thoroughly and allow the pellet to dry
VI. Pipette 1 µl of supernatant onto the MALDI target	VI. Allow to dry	VI. Add 5-10 µl Formic Acid
VII. Allow to dry	VII. Cover with 1 µl HCCA matrix	VII. Incubate 5-10 min
VIII. Cover with 1 µl HCCA matrix		VIII. Add 5-10 µl Acetonitrile
		IX. Vortex for 20 s
		X. Proceed as in V from the MycoEX protocol

NTM species not present in the Mycobacteria Library 4.0	NTM species not present in the Mycobacteria Library 5.0
<i>M. alsense</i>	<i>M. arcueilense</i>
<i>M. angelicum</i>	<i>M. bouchedurhonense</i> ^a
<i>M. anyangense</i>	<i>M. helvum</i>
<i>M. arcueilense</i>	<i>M. lutetiense</i>
<i>M. bouchedurhonense</i> ^a	<i>M. montmartrense</i>

NTM species not present in the Mycobacteria Library 4.0	NTM species not present in the Mycobacteria Library 5.0
<i>M. helvum</i>	<i>M. oryzae</i>
<i>M. lutetiense</i>	<i>M. paraintracellulare</i>
<i>M. montmartrense</i>	<i>M. paraterrae</i>
<i>M. oryzae</i>	<i>M. sarraceniae</i>
<i>M. paraintracellulare</i>	<i>M. timonense</i> ^a
<i>M. paraterrae</i>	<i>M. ulcerans</i> ^b
<i>M. saopaulense</i>	<i>M. yongonense</i> ^c
<i>M. sarraceniae</i>	
<i>M. saskatchewanense</i>	
<i>M. timonense</i> ^a	
<i>M. ulcerans</i> ^b	
<i>M. yongonense</i> ^c	

^a*M. bouchardurhonense* and *M. timonense* are members of the *M. avium* complex and show high confidence matches with *M. avium* reference entries.

^b*M. ulcerans* has not been analysed at the time of publishing these libraries and it is therefore possible to obtain an *M. marium* match for *M. ulcerans* isolates. The photo-chromogenic behaviour of these species can be used for differentiation purposes.

^c*M. yongonense* has been closely related to *M. intracellulare* and shows highconfidence matches with these reference entries.

Table 1 – List of NTM species lacking in the most updated Mycobacteria databases (Mycobacteria Library 4.0 and 5.0) provided by Bruker Daltonics. According to the Release Notes from these libraries.

IGRA metody v rutinním provozu – QuantiFERON®-TB Gold nebo T-SPOT.TB?

Autoři: J. Amlerová; J. Hrabák.

Působíště autorů: Ústav mikrobiologie a Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Plzni, Univerzita Karlova.

Vyšlo v časopise: Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 65, 2016, č. 4, s. 246-248

Kategorie: Krátké sdělení

Klíčová slova: IGRA, *Mycobacterium tuberculosis*, Quantiferon, T-SPOT.TB

Souhrn

V současné době jsou pro nepřímou diagnostiku tuberkulózy k rutinnímu použití dostupné dvě komerční IGRA (Interferon Gamma Release Assay) metody – starší QuantiFERON®-TB Gold, nově na trhu dostupná verze QuantiFERON®-TB Gold Plus (čtyřkumavková, s diferenciací aktivity CD4+ a CD8+) a T-SPOT.TB. Obě využívají podobný princip, ale liší se v provedení. Ve sdělení jsou porovnány výsledky vyšetření 284 pacientů, u nichž byly provedeny obě metody. Shoda ve výsledcích obou metod byla v 81,3 %, což odpovídá hodnocení indexem Cohenovým kappa 0,72. Pro správnou interpretaci IGRA je při rozporu výsledku jedné z metod s dalšími nálezy u pacienta (klinický stav, zobrazovací metody apod.) vhodné výsledky potvrdit provedením druhé metody.

Abstract

For indirect diagnosis of tuberculosis, two commercial IGRA (Interferon Gamma Release Assay) assays are available – primal QuantiFERON®-TB Gold test, new version QuantiFERON®-TB Gold Plus test (four tube, differentiation in activity CD4+ a CD8+) and T-SPOT.TB test. Both methods are based on the same principle, but their workflows are different. In this article, both assays are compared on the collection of 284 patients. Inter-rate agreement measure showed 81.3% consistency and Cohen's kappa index was calculated as 0.72. In case of discrepancy between IGRA and other methods (clinical aspects, X-ray diagnostic, etc.), results should be confirmed by second IGRA assay for correct interpretation.

Úvod

IGRA (Interferon Gamma Release Assay) metody jsou již zařazeny do rutinních postupů nepřímé diagnostiky tuberkulózy, zejména její latentní formy (LTBI). V současné době jsou v ČR dostupné dvě metody: QuantiFERON®-TB Gold (QFT), resp. nová varianta QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT Plus), se stejným postupem, ale vyšší citlivostí (Qiagen, Germany) a T-SPOT.TB (Oxford Immunotec

Ltd, UK). Obě metody využívají podobný princip – produkci interferonu gama (IF- γ) efektorovými T-lymfocyty (CD4+ a CD8+) po jejich stimulaci in vitro antigeny specifickými pro *Mycobacterium tuberculosis*. Tyto antigeny nejsou přítomny u všech kmenů BCG a u většiny netuberkulózních mykobakterií s výjimkou *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum* [1]. Vyšetření se provádí u obou metod z nesrážlivé krve za použití heparinu nebo případně u metody T-SPOT.TB i citrátu sodného. Základním předpokladem správného provedení metody je šetrná manipulace se vzorky krve a jejich včasný transport do laboratoře tak, aby nedošlo k poškození lymfocytů a jejich funkce.

Metoda QFT používá specifické tuberkulózní peptidové antigeny ESAT-6, CFP-10 a TB-7.7. Inkubace odebrané krve (16-24 hod v 37 °C) probíhá ve zkumavce s antigeny TB Ag, ve zkumavce s mitogenem MIT a v negativní kontrole NIL (stanovení hladiny nescifického IF- γ v krvi, tzv. pozadí reakce). Ve zkumavce MIT je fytohemaglutinin – polyklonální stimulant T-lymfocytů, který slouží jako pozitivní kontrola imunitní odpovědi pacienta a současně jako kontrola správné manipulace s krví a inkubace [2]. Po inkubaci je oddělena plazma z jednotlivých zkumavek. Plazmu je možné uchovat 28 dní při teplotě 2-8 °C nebo při teplotě nižší než -20 °C 3 měsíce.

Produkce IF- γ je stanovena metodou ELISA, výsledek je kvantifikován porovnáním množství IF- γ ve zkumavkách s antigenem vůči zkumavkám NIL a MIT. Za cut off je považována hodnota rozdílu TB Ag a NIL 0,35 IU/ml při zachování rozdílu mezi MIT a NIL \geq 0,5 IU/ml a dalších kritérií podle výrobce.

V současné době je již na trhu dostupná nová varianta QFT – QuantiFERON[®]-TB Gold Plus, která stimuluje lymfocyty se specifickými antigeny ve dvou zkumavkách TB₁ a TB₂. Obě zkumavky obsahují stejné antigeny (ESAT-6 a CFP-10). Zkumavka TB₁ obsahuje peptidy z těchto antigenů navržené ke zjištění buněčné imunitní odpovědi z populace lymfocytů CD4+ (pomocné lymfocyty), zkumavka TB₂ pak sadu peptidů ke zjištění odpovědi CD8+ (cytotoxické lymfocyty). Použití zkumavek MIT a NIL je totožné jako v předchozí verzi, hodnocení je obdobné.

Principem metody T-SPOT.TB je in vitro detekce efektorových T lymfocytů senzibilizovaných opět specifickými tuberkulózními antigeny (ESAT6 a CFP10). Tato metoda je variantou spotové (otiskové) analýzy skvrn (ELISPOT) umožňující zjišťovat počet takto senzibilizovaných lymfocytů, přičemž každý z antigenů je analyzován zvlášť. Před provedením reakce se periferní krevní mononukleární buňky (PBMC) separují z periferní krve, promyjí, stanoví se jejich počet a do reakce se použije jejich standardizované množství. Reakce je prováděna v mikrotitrační destičce, ve čtyřech jamkách – negativní kontrola (zjištění aktivity nescifických buněk), TB specifické antigeny ve dvou jamkách (panel A – ESAT6 a panel B – CFP10) a pozitivní kontrola (fytohemaglutinin k potvrzení funkčnosti PBMC) [3]. Inkubace probíhá 16-20 hod v 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂. Po inkubaci je provedena reakce ELISPOT. Po dokončení reakce je hodnocen počet spotů v jednotlivých jamkách, kdy každý spot představuje otisk jednoho T-lymfocytu vylučujícího cytokin IF- γ . Výsledek vychází z rozdílu počtu spotů v každé z jamek s antigenem a počtu spotů v negativní kontrole. Hranice

pozitivity je stanovena na výsledek 6 spotů aspoň pro jednu z jamek za dodržení dalších kritérií hodnocení dle výrobce. Výsledný počet spotů 5-7 lze považovat za hraniční. Metoda ELISPOT má vyšší senzitivitu než ELISA, protože detekuje cílový cytokin (IF- γ) přímo u buňky, která ho vytváří, zatímco u metod ELISA může být IF- γ rozpuštěn v supernatantu, zachycen receptory ostatních buněk nebo zničen [4, 5].

Obě metody lze považovat za vysoce specifické a senzitivní při vědomí obtížné konfirmace přítomnosti TB antigenů v organismu, zejména při LTBI. Míra senzitivity závisí na formě tuberkulózy (latentní – aktivní), případně i na charakteristice stavu pacienta (věk, přidružená onemocnění apod.) [6].

Před klinikem i laboratorním pracovníkem stojí volba, kterou z těchto metod indikovat pro vyšetření v konkrétním případě a kterou zařadit do rutinního laboratorního provozu. V tomto sdělení jsou porovnány výsledky vyšetření oběma metodami u 284 nemocných.

Materiál a metody

Soubor pacientů

V období od 10. 5. 2012 do 31. 7. 2015 bylo vyšetřeno celkem 284 pacientů. U každého z nich byl proveden odběr krve na klinickém pracovišti ambulantního nebo lůžkového typu. Odběry vzorků pro obě metody byly provedeny z jedné venepunkce nebo v odstupu maximálně 14 dní (průměr 3,09 dne). Do souboru byli zařazeni pacienti s různými diagnózami, včetně pacientů před nebo na biologické léčbě (n=89), pacientů po kontaktu s tuberkulózou (TB) (n=42), pacientů s primární plicní malignitou (n=9) a pacientů s bakteriologicky ověřenou tuberkulózou (n=12). V souboru bylo 153 mužů a 131 žen. Ve věku 0-18 let bylo 8 pacientů, 19-50 let 108 pacientů, 51-70 let 120 a 71 a více let 48 pacientů.

Vyšetření

Vzorky tohoto souboru byly vyšetřeny metodou QuantiFERON[®]-TB Gold varianta In Tube.

Krev na QFT byla odebrána do odběrové soupravy tří zkumavek po 1 ml (TBAG, NIL a MIT), manipulace s krví proběhla podle doporučení výrobce (8-10x promícháno). Odběr na T-SPOT.TB byl proveden do zkumavky s protisrážlivým přípravkem lithium-heparinem (8 ml, u dětí do 9 let 4 ml). V obou případech byla krev doručena do laboratoře do 5 hodin po odběru (limit metody je 16 hodin u QFT a 8 hodin u T-SPOT.TB). Krev pro QFT byla znovu promíchána a inkubována 16-24 hod při 37 °C.

Krev pro T-SPOT.TB byla zpracována max. 8 hodin po odběru. Lymfocyty byly separovány pomocí zkumavek Leucosep (Oxford Immunotec Ltd, UK), počet lymfocytů byl hodnocen po obarvení trypanovou modří v jednorázové plastové počítací mřížce. Lymfocyty byly do reakce naředěny na standardní množství $2,5 \times 10^6$ buněk/ml.

Hodnocení výsledků probíhalo podle doporučení výrobců jednotlivých souprav. Shoda obou metod byla vyhodnocena Cohenovým kappa po vyřazení neurčených výsledků v metodě QFT.

Výsledky

Shoda výsledků v obou metodách činila 81,3 % (viz tabulka č. 1). Neurčených výsledků v QFT bylo 30, při provedení metodou T-SPOT.TB z nich bylo 27 negativních a 3 pozitivní (viz tabulka č. 2). Výsledky byly rozděleny podle indikačních skupin, kde má stanovení IGRA významnou roli pro určení diagnózy nebo pro další vývoj onemocnění, tzn. pacienti před nebo na biologické léčbě, pacienti po kontaktu s TB, s primárním karcinomem plic a pacienti s následně kultivačně ověřenou TB (viz tabulka č. 1).

Výsledný kappa index byl 0,72, což je podle Landise – Kocha [7] hodnoceno jako shoda značná.

Diskuse

Výsledky této studie ukazují relativně vysokou shodu v obou metodách, podobné výsledky byly dosaženy i v jiných studiích, např. κ 0,83 – srovnávací studie u dětí (Connel 2008) [8].

Volba metody zařazené do rutinního provozu závisí na mnoha okolnostech. Je nezbytné brát v úvahu počet vyšetřovaných vzorků, provozní kapacitu laboratoře (personál, technické zázemí atd.). Metoda QFT je obecně méně náročná, jednoduše reprodukovatelná a opakovatelná. Existuje k ní EQA kontrola (systém externího hodnocení kvality). Plazmu po inkubaci je zde možné skladovat, vlastní ELISA lze tak provádět plánovaně s větším počtem vzorků (vhodné pro automatizaci a zpracování analyzátorů), manipulace se vzorkem i s plazmou je méně náročná na techniku a zkušenost laboratorního pracovníka. Metodu T-SPOT. TB je nutno provádět v den odběru, manipulace s lymfocyty vyžaduje větší erudici personálu, metoda je náročnější manuálně i na technické vybavení (separace lymfocytů, chlazená centrifuga, inkubátor CO₂ apod.). Je obtížněji reprodukovatelná a opakovatelná. Kontrola EQA k této metodě není dostupná. Naproti tomu toto náročnější provedení umožňuje přesnější hodnocení jednotlivých fází metody – vědomí o kvalitě reagujících lymfocytů, vizuální zhodnocení inkubace (při chybné inkubaci změna barvy v destičce) atd. Podle našich zkušeností lze volit v rutinním provozu QFT jako metodu základní z důvodu snadnějšího provedení a důvodů ekonomických, metodu T-SPOT.TB pak jako metodu konfirmační u neurčených výsledků QFT, u výsledků hraničních nebo u výsledků nekorespondujících s dalšími nálezy u pacienta.

Závěr

Metody IGRA jednoznačně představují přínos v diagnostice tuberkulózy. Volba komerčně dostupných metod závisí na provozu provádějící laboratoře. Kvalita výsledku závisí na celém procesu, vč. manipulace se vzorkem v preanalytické fázi.

Interpretace výsledků obou dostupných metod musí probíhat vždy v souvislosti s klinickým stavem pacienta a s jeho dalšími nálezy. Proto je vhodné při rozporu výsledku IGRA s dalšími okolnostmi konfirmovat výsledek druhou metodou, při nedostupnosti druhé metody alespoň opakovat vyšetření. Vždy je nutné mít na paměti, že diagnóza aktivní tuberkulózy, respektive její vyloučení, nesmí být stanovena pouze na základě výsledku IGRA. Výsledek IGRA informuje klinika pouze o pravděpodobné nebo nepravděpodobné přítomnosti tuberkulózního antigenu v organismu.

Poděkování

Práce byla podpořena projektem PRVOUK P36 – Náhrada, podpora a regenerace funkce některých životně důležitých tkání a orgánů a Národního programu udržitelnosti č. LO1503 poskytovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Tabulka č. 1 – Výsledky vyšetření metodami QuantiFERON®-TB Gold a T-SPOT.TB (určené vzorky)

Výsledek metod	celkem	BL	Kontakt s TB	TU plic	Kult. ověř. TB	Jiná dg.
QFT N T-SPOT N	191	73	22	4	0	92
QFT P T-SPOT P	40	3	9	3	10	15
QFT P T-SPOT N	16	3	5	1	1	6
QFT N T-SPOT P	7	0	1	0	1	5
Shoda %	81,3	85,4	73,8	77,8	83,3	81,1
Neshoda%	8,1	3,4	14,3	11,1	16,7	8,3

Pozn.: vzorky s QFT neurčeno byly řazeny zvlášť (viz tabulka č. 2) – tedy ani shoda ani neshoda
Použité zkratky: N – negativní, P – pozitivní, BL – biologická léčba, TU – primární plicní tumor, kult. ověř. TB – kultivačně ověřená tuberkulóza.

Tabulka č. 2 – Výsledky vyšetření metodami QuantiFERON®-TB Gold a T-SPOT.TB – neurčené vzorky metodou QFT

Výsledek metod	celkem	BL	Kontakt s TB	TU plic	Kult. ověř. TB	Jiná dg.
QF N	T-SPOT N	27	10	4	0	13
	T-SPOT P	3	0	1	1	1
QF N v %	10,6	11,2	11,9	11,1	0	10,6

Použité zkratky: N – negativní, P – pozitivní, BL – biologická léčba, TU – primární plicní tumor, kult. ověř. TB – kultivačně ověřená tuberkulóza.

Literatura

1. Andersen P, Munk ME, Pollock JM et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, 2000;356(9235):1099-1104.
2. Woo KS, Choi JL, Kim BR et al. Significance of interferon-gamma response to mitogen in serial QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay of routine laboratory practice. *Clin Chim Acta*, 2014;430:79-83.

3. NCCLS Approved Guideline. *Performance of single Cell Immune Response Assays I/LA26-A* [online]. 2013-11, [cit. 2016-04-25]. Dostupný na [www: <http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/ILA26A2_sample.pdf>](http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/ILA26A2_sample.pdf)
4. Tanguay S, Killion JJ. Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res*, 1994;13(4):259-63.
5. Favre N, Bordmann G, Rudin W. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *J Immunol Methods*, 1997;204(1):57-66.
6. Chee CBE, Gan SH, KhinMar kW et al. Comparison of Sensitivities of Two Commercial Gamma Interferon Release Assays for Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2008;46(6): 1935-1940.
7. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 1977;33(1):159-174.
8. Connell TG, Ritz N, Paxton GA et al. Comparison of Tuberculin Skin Testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in Children. *PLoS ONE*, 2008;3(7):e2624.

Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using whole genome sequencing

Authors: Jana Amlerova, Ibrahim Bitar, Jaroslav Hrabak

Abstract

Tuberculosis (TB) is considered one of the most serious infectious diseases worldwide. Effective control of tuberculosis infection involves multiple steps, such as reliable detection, treatment, an epidemiological control as a part of case management, and further surveillance and monitoring of TB spread in the human population. Due to the accelerating advances in molecular biology, especially in DNA sequencing, in the past decade, the application of these methods has become crucial for TB evolution studies, differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes, and their distribution. Currently, several molecular genetic methods are available. The oldest typing methods (e.g., IS6110-RFLP, spoligotyping, and MIRU-VNTR) can discover the chain of transmission to the patient. Currently, whole genome sequencing facilitates is furthermore able to identify the source of infection, the transmission trays among individuals sharing the same isolate, as well as determination of the TB evolution and its resistance to antituberculous agents. It is obvious that this technique will become a new gold standard in genotyping methods in tuberculosis molecular epidemiological studies. In this article, molecular genetic typing methods with a special focus on whole genome sequencing and data management are reviewed.

Introduction

Tuberculosis (TB) has a very old and rich history. Hippocrates named TB as the most enhanced disease with blood expectoration and with high lethality (Hippocrates (410–400BCE)). In Middle Ages TB incidence in Europe was relatively low, but in seventeenth and eighteenth century, TB became feared disease by the influence of industrialization, by migration population from the country to the cities, and by the naval trading development. In the beginning of nineteenth century, TB was the most frequent disease and nearly one quarter of adult population died of TB (Holčíková 2009). Based on current epidemiological analysis, including paleomicrobiological approach, TB was found worldwide, including American continents (Salo et al. 1994).

Since the discovery by Robert Koch in 1882 (Koch 1882), *Mycobacterium tuberculosis*, causative agent of TB, has been extensively studied.

Nowadays, TB represents a major health problem worldwide. Although the human population has been in contact with tuberculosis for many centuries, 30% of the people all over the world possess tuberculosis bacilli in their body. The active disease develops in 5–10% of them, causing 2 million

deaths annually. Ninety percent of those infected people live in low- or middle-income countries (WHO 2016). Thus, WHO declared TB as a global emergency problem in 1993. Based on their data, 22 countries were qualified as highly endemic, which contributed about 80% of global burden (Ali 2014). For effective TB control, well-timed diagnostics, initiation of appropriate therapy, and understanding of TB epidemiology are crucial.

Taxonomy of *M. tuberculosis*

Genus *Mycobacterium* includes two groups of mycobacterial types distinguished by their pathogenicity. In the first group, there are obligatory pathogens of complex *M. tuberculosis* and *M. leprae* species. In the latter one, there are species known as nontuberculosis mycobacteria (NTM) or mycobacteria other than tuberculosis (MOTT). This group contains many species differed by genotypic and phenotypic characteristic and by pathogenicity level as well. Their members are also characterized by high level of resistance against antitubercotics. Those species, however, do not represent a serious epidemiological problem, because no interhuman transmission has been documented. Contrary to NTM, the species of *M. tuberculosis* complex are transmitted from person to person through airborne droplets representing a serious epidemiological risk causing one of the most important infectious diseases worldwide.

M. tuberculosis complex has very old evolutionary history, with an ancestral strain so-called *M. prototuberculosis* occurred in Africa 3 million years ago (Gutierrez et al. 2005) which started to be spread from east Africa 40,000 years ago (Wirth et al. 2008). Within the complex, several species has been described – *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, and newly described species *M. mungi* and *M. orygis* (Van Ingen et al. 2012). They differ widely in terms of their host tropisms, phenotypes, and pathogenicity. All members, however, are closely related based on their genetic level (Sreevatsan et al. 1997) with > 99.9% nucleotide homology and identical 16S rRNA sequences (Brosch et al. 2002).

Despite that fact, *M. tuberculosis* species can be further divided into genetic groups (subspecies level) based on the differences in their virulence, immunogenicity, and geographical distributions (Gagneux and Small 2007). Taxonomy of *M. tuberculosis* is summarized in the Table 1.

Table 1 – *Mycobacterium tuberculosis* – the taxonomy subsumption (according to BioLib Biological Library, 2016)

System	Vitae – living organisms
Domain	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Class	Actinobacteria
Subclass	Actinobacteridae
Order	Actinomycetales
Suborder	Corynebacterineae
Family	Mycobacteriaceae
Genus	Mycobacterium
Complex of species	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Species	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Genotyping of *M. tuberculosis* complex

In *M. tuberculosis* isolates, routine identification to the species level is performed by phenotypic and biochemical analysis, which is, however, time-consuming. In recent years, various molecular methods have been developed for identification of the isolates, to distinguish their genotype and to detect mutation in their antituberculous-resistant variant. *M. tuberculosis* is considered genetically monomorphic, with very low genetic diversity. Nevertheless, substantial genetic variations of *M. tuberculosis* allow distinguishing various genotypes, especially based on their geographical occurrence.

Kato-Maeda et al. (2011); Orduz and Ribón (2015); and Ei et al. (2016) reviews molecular genetic typing methods used for characterization of *M. tuberculosis*. Comparison of genotyping methods is shown in Table 2. The first molecular genetic typing methods, the so-called fingerprinting, have been based on the PCR amplification of genomic markers by PCR followed by agarose gel electrophoresis.

Table 2 – Genotyping methods used in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology—evaluation

Method	Marker	Principle	Advantages	Disadvantages	Application
RFLP	IS6110	Number of IS6110 presents copies and molecular weight of DNA fragments contains these ones.	High discriminatory power Stable Reproducible Well standardized ^{b, c, d, e}	Low discriminatory power in isolates with low number of IS6110 Necessity of large number of DNA Time-consuming ^{a, b, c, e, g}	Widely used Difficult comparing results between labs Time-consuming process ^{c, e}
RFLP	PGRS	Number and location of PGRS regions	High discriminatory power ^{b, e, g}	Necessity of large number of DNA Difficult analysis Limited data acquisition Time-consuming process ^{a, b, d, e, g}	Discriminating isolates with low number of IS6110 Not possible comparing results between labs ^{b, e}
Spoligo-typing	DR loci	Presents of spacers between direct repeat sequences Polymorphism in DR loci	Implementation directly from sputum Highly reproducible Data in digital format Easy to interpret Simple, rapid Necessity of low number of DNA ^{a, b, c, d, e, f}	Limited discriminatory power—single pattern in Beijing family ^{b, d, e}	Interlabs cooperation (using free web tool—online database) ^c
MIRU-VNTR	MIRU loci	Polymorphism of MIRU loci	High discriminatory power Data in digital format Rapid, reproducible Cost effective Necessity of low DNA number ^{a, b, c, d, e, g}	Lower discriminatory power than IS6110 in set of 12 loci ^e	24 loci used for molecular epidemiology Interlabs cooperation and comparison (using free web tool—online database) ^{b, c, g}
Rep-PCR	Repetitive DNA elements (Rep)	Polymorphism of fraction delineated by Rep	Simple, fast Cost effective ^c	Less reproducibility ^c	Highly discrimination for Beijing genotype ^c

Drug-resistant mutation	Mutation associated with AT drugs resistance	Detection mutations in specific sequences		Insufficient for epidemiological genotyping	Separately only for the isolate susceptibility interpretation
WGS	Whole genome sequences	Sequence analysis of genome	High discriminatory power ^c	Expensive Need of specialized technology and software ^{c, e}	The most accurate method for molecular epidemiology and phylogenetic classification

^aBurgos et al., 2004, ^bDesikan and Narayanan, 2015, ^cEi et al., 2016, ^dJang et al., 2011, ^eKato-Maeda et al., 2011, ^fRamos et al., 2014, ^gRozo-Anaya and Ribón, 2010

Genetic markers of *M. tuberculosis* mentioned above are defined as a variability in numbers and locations of insertion sequences IS 6110 or PGRS regions, both detected as various molecular weights of DNA fragments containing those markers—Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Other methods for typing include detection of polymorphisms in the direct repeat loci as member of the CRISPRs (spoligotyping), polymorphisms of MIRU loci, drug-resistant mutations, large sequence polymorphism (presence or absence of specific segments of DNA), and specific DNA sequences of multiple loci. Recently, whole genome sequencing has been introduced to type epidemiologically important bacteria, including *M. tuberculosis*. In some countries, this technique is already used to characterize all clinical isolates. Therefore, it has a potential to replace all the methods mentioned above, as complete information of genetic code is available (Kanduma et al. 2003; Kato-Maeda et al. 2011). In the followed paragraphs, the principle of all mentioned typing methods is described.

IS6110-RFLP

This method has been determined as the gold standard typing method for molecular epidemiologic studies until recent time (Kato-Maeda et al. 2011; Ei et al. 2016). Its discriminatory power is high (Kato-Maeda et al. 2011); therefore, it has been widely used since early 1990s for comparison of studies. The method is based on a detection of specific mobile genetic element-insertion sequence (IS) IS6110 which is specific for *M. tuberculosis* complex. IS6110 belong to the IS₃ family group IS51; it is 1354 bp (van Embden et al. 1993; Sankar et al. 2011; Siguier et al. 2006).

Typically, 0 to 25 copies of IS6110 are present in *M. tuberculosis*, most of which carry 8 to 15 copies (e.g., H37Rv *M. tuberculosis* possess 16 copies of IS6110 in the genome). Discriminatory power of RFLP is dependent on the numbers of IS6110, significantly decreasing in strains with five or less copies in the genome. The insertion site of IS6110 in *M. tuberculosis* genome has not yet been identified; however, it is supposed that the transposition does not occur randomly (Kim et al. 2010; Kato-Maeda et al. 2011) and that the transposition frequency is thought to be as low as one single transposition event over a 58-year-old period (cave et al. 1991). Kim et al. (2010) also proposed several loci as putative integration regions, but yet to be verified.

Based on the principle of the RFLP, the variability of IS6110 copy number, and the transposition site, the molecular weights of DNA restriction fragments are detected. Briefly, after DNA extraction, DNA is fragmented to several hundred fragments by the restriction enzyme PvuII. Some of the fragments harbor the region that contains IS6110; the fragments are separated by agarose electrophoresis and transferred to a membrane via Southern blot hybridization with a labeled probe coupled to the IS6110 specific sequence (complementary to the 3' end). The probe is prepared in vitro amplification of the 245-bp fragment by PCR and labeled by the relative material. Fragments containing IS6110 are then detected and the resulting pattern represents specific genotype. Each fragment visualized represents one copy of the IS6110 flanked with different DNA sequences that have different size depending on the PvuII restriction site. Due to the need to compare the band pattern of a certain isolate with previously analyzed samples (for epidemiological purposes), a computer program has been developed for this purpose in which the RFLP image on the membrane is transferred and digitalized and the relative patterns can be saved for later use or compared with previous ones. The main disadvantages of this method are the necessity of high concentration of a high quality of input DNA (2–3 µg), sophisticated procedure, and expensive computer software and most importantly the stability of the insertion sequence. The band pattern profile is not definite forever, meaning that the profile of the same sample could change after time. This is due to the nature of insertion sequences which tend to move (for reasons to be identified), and thus over time, the sample could have a change in the band pattern profile. The half time of the pattern change varies; it could range from 3.2 to 8.74 years (Ei et al. 2016).

Another insertion sequence-IS1081-could also be used for genotyping; however, its discriminatory power is lower. Therefore, it is not used for routine genotyping (Orduz and Ribón 2015).

PGRS-RFLP

Isolates that have small number of IS6110 (five or less) are more difficult to be differentiated using IS6110-RFLP. Therefore, another method, PGRS-RFLP, was developed by Rhee et al. (2000) to address this problem. PGRS (polymorphic GC-rich repetitive sequence) is present in multiple sets of GC-rich copies in the *M. tuberculosis* chromosome in several regions. Those sequences have sufficient stability over time, much higher than that of IS6110. Therefore, discriminatory power of this assay is lower. Similarly to IS6110-RFLP, specific GC-rich sequences are detected by a similar way as described above (Rhee et al. 2000; Kato-Maeda et al. 2011).

Spoligotyping

In this method, hybridization of direct repeat regions (DR) in the genomic DNA of *M. tuberculosis* is used for typing. DRs are members of the CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) (Zhang et al. 2010). Those sequences form so-called variable repeat regions (DVRs) that combine DRs interspersed by a unique DNA spacer. Contrary to DR with stable 36 bp length, spacers differ in their sequence and length (35–41 bp). Currently, 94 spacers have been identified but only 43

of them are used for common genotyping. The presence or absence of 43 spacer DNA sequences and their variability is typical for different genotypes (Ei et al. 2016). The term “spoligotyping” therefore is derived from “spacer oligonucleotide typing.”

Briefly, the DR locus is amplified by PCR using primers complementary for the DR sequences. The products can be visualized by two different principles. In the first one, PCR products are hybridized on a membrane that contains 43 spacer oligonucleotides. Each of these spacers will either produce a band (presence of the spacer) or will have no band (absence of the spacer). Therefore, each isolate will produce a series of band pattern, which is converted to a 43-digit binary code system (1 means the presence of a band and 0 is the absence). Then this system is converted to a 15-digit octa-numbers. The combination of these octa-numbers present unique band patterns that represent a certain clone. In other words, different clones will have different band pattern which will have different combination of the 15 octa-numbers. The 15 octa-numbers can be easily interpreted and sequence types can be assigned through an online database (<http://pasteur-guadeloupe.fr.8081>) (Ei et al. 2016). The second approach includes their amplification by fluorescently labeled primers followed by size determination using capillary electrophoresis (Kato-Maeda et al. 2011).

Because of PCR amplification of the DNA, low input amount of DNA is needed (20–50 ng). Therefore, the assay can be used directly from the clinical specimen without the need of pure culture (Kamerbeek et al. 1997; Kato-Maeda et al. 2011; Ei et al. 2016). Interpretation of the method is also relatively simple, using binary or octal numeral system. Therefore, this method can be used for interlaboratory testing, allowing construction of global databases for comparative studies (Jagielski et al. 2014). Comparing with IS6110-RFLP and further methods mentioned below, lower discrimination power is reported (Kamerbeek et al. 1997).

MIRU-VNTR

MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) are loci found in the genome of *M. tuberculosis* with the length of 40–100 bp DNA that belong to the group of minisatellites (Supply et al. 2001; Sun et al. 2016). In the genome, they are dispersed as tandem repeats; *M. tuberculosis* H37Rv contains 41 MIRU loci, from which 12 showed polymorphisms, thus used for routine genotyping (Ei et al. 2016; Sun et al. 2016). Similar to IS6110, the number of their copies varies among strains. Thus, the method based on MIRU loci characteristics is called Variable Number Tandem Repeats (VNTR). For typing purpose, number and size of repetition in every such locus are characterized by PCR and consequential gel electrophoresis. Especially, the number of repeated polymorphism within the tandemly arranged repetitive DNA sequences is detected (Ramos et al. 2014). The method principle is based on the PCR of 12 VNTR region, in which the primers anneal to the flanking regions of the loci, and then the products are visualized by gel electrophoresis. PCR product sizes represent the tandem repeat unit which is converted to a numeric code. This code is used to extract digital format results in which each digit correspond to the number of the copies found for a specific locus. For convenient

performance, PCR is designed as a multiplex reaction where one of the primer pair is tagged with a different fluorescent dye. Amplicons are then detected via automatic capillary electrophoresis—DNA sequencer.

Because of the high discrimination power and reproducibility, this method can be considered as a gold standard for *M. tuberculosis* genotyping (Kato-Maeda et al. 2011; Supply et al. 2001). Similarly to IS6110-RFLP, however, DNA extracted from a pure culture is required. Moreover, some PCR may result negative for some loci in a specific strain; this could be the result of the deletion of the region or the high number of repeat units. On the other hand, in specific cases, double alleles could be found at the same locus which will be considered a clonal variant of the same strain. If the double alleles exceed two loci, the infection is then considered to be mixed (Ei et al. 2016; Sun et al., 2016).

Other PCR-based methods

Rep-PCR (repetitive element sequence based-polymerase chain reaction) is based on PCR amplification of the genomic regions between repeat elements, which are spaced throughout the genome (Farber 1996; Jagielski et al. 2014). Various size DNA fractions are detected by electrophoresis. The genetic relatedness is deduced from comparing the band pattern produced by the gel electrophoresis, the number of repetitive elements, and the position of these elements in the genome. For its high discriminatory power, it can be used for isolates that cannot be typed by RFLP (low number of copies) or by MIRU-VNTR (Beijing genotype). In this case, other repetitive elements than IS6110 are used.

Other types of methods are used very rarely due to their low differential ability or difficult implementation.

Drug resistance-associated mutation

Resistance to antituberculars in *M. tuberculosis* is usually caused by mutations in target genes (Gillespie 2002). The main drug resistance-associated mutations detected in *M. tuberculosis* are detected in *rpoB* gene-rifampin resistance (Telenti et al. 1993) and *katG* and *inhA* genes determining resistance to isoniazid (Heym et al. 1999). The strains of *M. tuberculosis* resistant to at least isoniazid and rifampin, the two most potent TB drugs, are considered as multidrug resistant (MDR). Detection of mutations responsible for drug resistance does not allow, however, discrimination of clonality of the strains. For epidemiological purpose, the method must be combined with another typing technique to determine geographical origin of the isolate.

Whole genome sequencing

The first complete genome of reference strain H37Rv was published in 1998 (Cole et al. 1998) and reinterpreted in 2002 (Camus et al. 2002). For that purpose, however, sequencing was performed by Sanger method which is not suitable for routine sequencing of common isolates because of labor intensity and cost.

The technology allowing routine sequencing of complete genome has been developed in the last two decades. They are denoted as next generation sequencing (NGS). Currently, there are several sequencing platforms for different implementation purposes (Ansorge 2016). The main advantage of NGS is the possibility to simultaneously sequence multiple DNA samples during the same run. This process is designated as “barcoding” in which each sample is tagged by a specific marker, so that when the data is retrieved, the readings will be sorted according to the relative tag. For this reason, this approach can be also called “massive parallel sequencing.” Nevertheless, enormous output data quantity is commonly produced, which leads to the need of other specialists—bioinformaticians—that are needed for properly analyzing the data.

The process of WGS starts by DNA extraction and purification. Normally, there are a lot of commercial kits that will lead to the extraction of purified high molecular weight DNA. In the currently most common technique, the so-called second generation sequencing (Illumina approach), genomic DNA is commonly fragmented chemically (enzyme driven fragmentation) into short molecules (100–500 bp). After that, their ends are blunt and connected to specific oligonucleotides called adapters. These fragments are usually amplified by PCR and final DNA library is applied on the sequencer. After the run is finished, two reads for each genome is generated. These reads should be assembled; this step actually tries to overlap reads together to construct a piece of the DNA sequenced. There are a lot of assembling pipeline available such as VELVET, A5MISEQ, SPADES, etc., or the reads can be uploaded to some online assembling software. After the assembling process is finished, the result file will be a file that contains a number of contigs (DNA sequences) that the assembler could not close. The number of contigs per sample is different not only for different samples but also may differ to the same sample for different runs; it depends on the library preparation, genome nature, assembling pipeline, etc. Another approach, also called single cell sequencing, allows sequencing of long DNA fragments (e.g., > 30 kb up to 60 kb) which results in the acquisition of almost complete closed bacterial genome. Those promising techniques (e.g., PacBio, MinION) still show high error rate, and in most cases, the genome as to be sequenced again using Illumina approach and then reads of both techniques are used be assembled using “hybrid assembler” which will correct the errors in the long reads fragments and also in most cases end up in closing the genome, leading to have one contig for the whole genome. Therefore, they are usually used to construct the genome reference with subsequent resequencing using the platform mentioned above (e.g., Illumina).

For TB genotyping, technologies with short read data but high sequence quality (low error rate), such as Illumina MiSeq, are recommended (Lee and Behr 2016). It is necessary to mention that WGS data allows acquisition of all information obtained by all the previously described typing methods mentioned above. Therefore, previously collected data may be used for historical description of *M. tuberculosis* evolution. WGS is also able to detect mutation in genes responsible for drug resistance that can be directly used for specific treatment of the patient.

Moreover, NGS is able to differentiate isolates in outbreaks or reinfections. The genomes assembled can be compared visually using some software such as MAUVE. This software allows the mapping of the contigs to reference genome, and allow the comparison of different genomes together based on SNPS analysis. Moreover, phylogenetic tree can be constructed based on the comparison conducted before. The amount of data generated can be used in many ways including comparing genome collected in an outbreak, comparison of the genomes with other genomes uploaded to different databases, identification of *M. tuberculosis* lineages, and also detecting mutations in certain genes of interest. The online database (<http://pathogenseq.lshtm.ac.uk/>) provides a solid database and contains important tools for genotyping *M. tuberculosis* and other important usages. Unfortunately, the price of the sequencing is still relatively high limiting the use of the method in developed countries with low TB incidence and specialized data analysis is also required.

Lineages of *Mycobacterium tuberculosis*

Based on molecular genetic typing data, different tuberculosis lineages distributed worldwide have been identified (Brudey et al. 2006; Demay et al. 2012; Orduz and Ribón 2015). The main lineages are mentioned below (for geographical distribution see Fig. 1):

1. Haarlem—highly prevalent in Europe, especially in Russia, includes four sublineages
2. LAM (Latin America and Mediterranean)—frequently identified in Mediterranean and Latin American countries. This type can be further divided according to geographic association (e.g., LAM₁₀ Cameroon, LAM₇ Turkey, LAM₁₁ Zimbabwe, or LAM₁₂ Madrid₁)
3. T lineage—“default”—includes “modern” TB strains that are genetically homogenous limited their subclassification into other groups. It occurs relatively equal in the world, with a maximum occurrence in Europe. It can be divided due to geographical occurrence (T₁–T₅)
4. X lineage—“Anglo-Saxon”—highly prevalent in USA, with lower prevalence in Latin America and in Mexico
5. EAI (East African-Indian) occurs in South East Asia, India, and Western Africa. It is divided to four sublineages (EAI₂ Nonthaburi, EAI₆ Bangladesh/1, EAI₇ Bangladesh/2, and EAI₈ Madagascar)
6. CAS (Central Asian)—highly prevalent in sub-Saharan countries and Pakistan. This genotype comprises other subgroups as CAS₁ Kili (Kilimanjaro), CAS Dar (Dar-es-Salaam), and CAS₁
7. Delhi Beijing—high virulence and associated with multidrug resistance characterize this lineage. It occurs mainly in Far East Asia (50% of all isolates) and in Russia (Ei et al. 2016);
8. MANU—this may be an ancestral clone of the genetics group 1. The MANU was recently described in India, subdivided into three subgroups—MANU 1–3.

9. S lineage—mentioned by some authors only (Brudey et al. 2006; Demay et al. 2012). Incidence of this lineage is quite low all over the world.

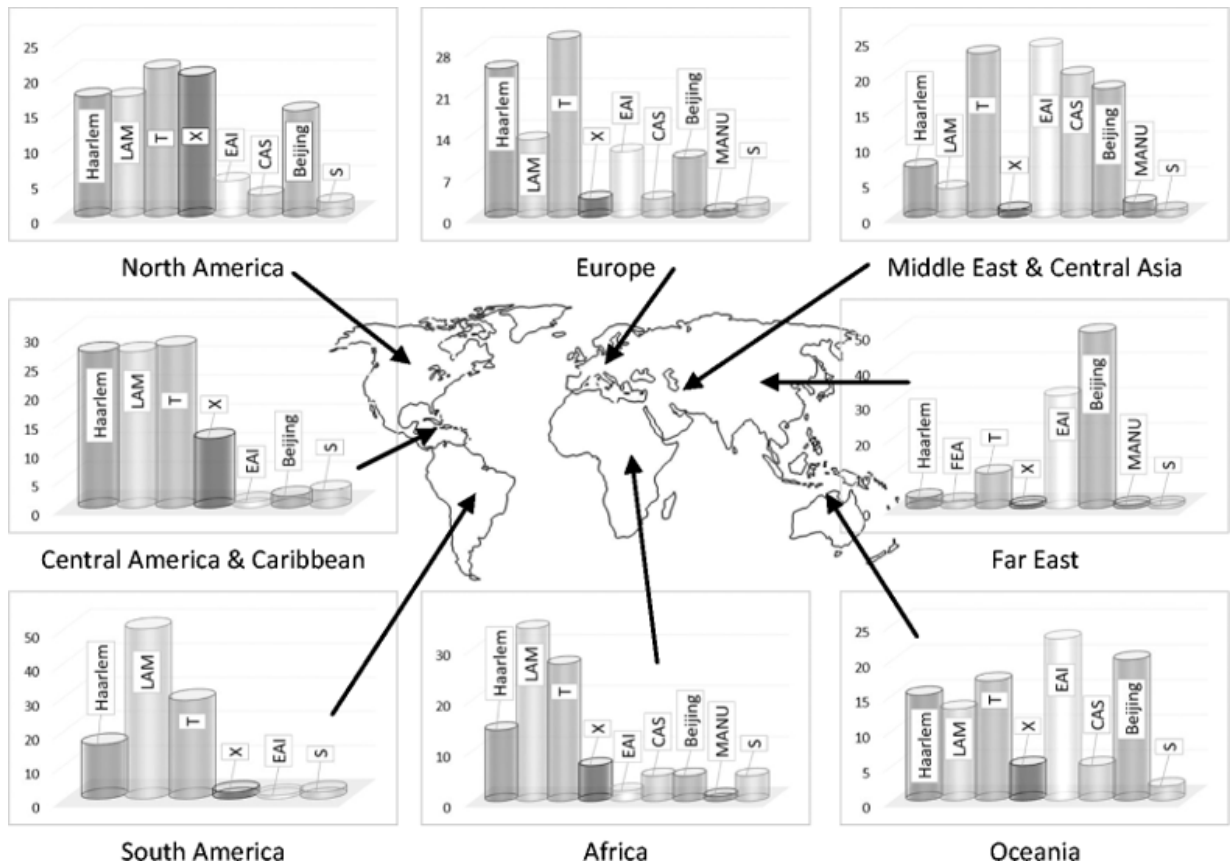


Fig. 1 - *Mycobacterium tuberculosis* - proportional approximate incidence of main lineages in the world (according to Brudey et al. 2006, Demay et al., 2012, Orduz and Ribón 2015)

In countries with low TB incidence, efficient control largely prevents the transmission. Therefore, according to the genetic characteristics, the strains isolated in such regions are evolutionary distant with no significant clonal spread. On the other hand, in regions with extensive TB transmissions, large number of very closely related strain is usually identified (e.g., Beijing genotype) (Luo et al. 2014). Discriminatory power of VNTR or IS6110-RFLP is very low in such strains; therefore, epidemiology may benefit from WGS typing.

Conclusion

Currently, the genotyping of *M. tuberculosis* is crucial for epidemiologic studies. It provides tracking specific isolates of *M. tuberculosis* in a community allowing determination of the transmission dynamics. In the epidemiological survey, the data acquired by IS6110-RFLP, spoligotyping, and MIRU-VNTR can discover the chain of transmission to the patient. Whole genome sequencing facilitates is furthermore able to identify the source of infection, the transmission trays among

individuals sharing the same isolate, as well as determination of the TB evolution. It is obvious that NGS will become a new gold standard in genotyping methods in tuberculosis molecular epidemiological studies. Moreover, molecular genetic techniques are able to detect drug resistance of TB isolates rapidly which support their importance in specialized TB diagnostic laboratories.

It is of note that TB genotyping has become the main part of worldwide TB control program coordinated by WHO. In some developed countries (e.g., UK), the National TB Genotyping Service (NTGS) was implemented (NHS National Health Service England, 2015). This policy will provide the best understanding of the TB epidemiology, uncovering enormous number of TB outbreaks and supply TB control in these countries and hence in Europe and all over the world. TB genotyping can also be a worthwhile tool in establishing the strain's geographic origin, differentiation of relapse, or reinfection cases or monitoring of lab cross-contamination. The WGS-NGS is one of the best tools to manage it (Gardy et al. 2011). As Ian Sutherland, London's physician and researcher, noted in 1970s, "one man's cure is many men's prevention" (Ali 2014).

Notes

Funding

This work was supported by the National Sustainability Program I (NPU I) No. LO1503 provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic and Charles University Research Fund PROGRES (Nr. Q39).

Compliance with ethical standards

Transparency declaration – There is none to declare.

References

1. Ali A (2014) *Mycobacterium tuberculosis* and molecular epidemiology: an overview. J Microbiol Res 4(6A):25–31. <https://doi.org/10.5923/s.microbiology.201401.04> CrossRefGoogle Scholar
2. Ansong WJ (2016) Next Generation DNA Sequencing (II): techniques, applications. Next Generat Sequenc Applic S1:005. <https://doi.org/10.4172/2469-9853.S1-005> CrossRefGoogle Scholar
3. BioLib Biological Library 2016. <http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id652871/>. Accessed 19 December 2016
4. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci U S A 99:3684–3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299> CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar
5. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA et al (2006) *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 6(23):23. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-23> CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar
6. Burgos MV, Méndez JC, Ribon W (2004) Molecular epidemiology of tuberculosis: methodology and applications. Biomedica 24(Supp 1):188–201CrossRefPubMedGoogle Scholar
7. Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST (2002) Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology 148:2967–2973CrossRefPubMedGoogle Scholar

8. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT (1991) IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes* 5(1):73–80 [CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
9. Cole ST, Barrell BG (1998) Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found Symp* 217:160–172 [CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
10. Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, Rastogi N (2012) SITVITWEB—a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 12:755–766. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.004> [CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
11. Desikan S, Narayanan S (2015) Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res* 141:761–774. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.160695> [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
12. Ei PW, Aung WW, Lee JS, Choi G-E, Chang CL (2016) Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a review of frequently used methods. *J Korean Med Sci* 31(11):1673–1683. <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.11.1673> [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
13. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM et al (1993) Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31:406–409 [PubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
14. Farber JM (1996) An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J Food Protect* 59(10):1091–1101. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.10.1091> [CrossRefGoogle Scholar](#)
15. Gagneux S, Small PM (2007) Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 7:328–337. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70108-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70108-1) [CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
16. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui JS, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK, Elwood K, Jones SJM, Brinkman FSL, Brunham RC, Tang P (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 364(8):730–739. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003176>
17. Gillespie SH (2002) Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Ch* 46(2):267–274. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.267-274.2002> [CrossRefGoogle Scholar](#)
18. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V (2005) Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 1(1):e5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010005> [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
19. Heym B, Saint-Joanis B, Cole ST (1999) The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle Lung Dis* 79(4):267–271. <https://doi.org/10.1054/tuld.1998.0208> [CrossRefGoogle Scholar](#)
20. Hippocratess (410–400 BCE). Book 1—Of the epidemics. In: Adams F (translator). *The genuine works of Hippocrates*. London: the Sydenham society, 1849. Facsimile edition 1985, The Classics of Medicine Library, Alabama, pp 352–354 [Google Scholar](#)
21. Holcikova A (2009) Mykobakteriální infekce a nokardioza. In: Beneš J. et al. *Infekční lékařství*. 1st edn. Galén, Praha, pp 227–228 [Google Scholar](#)
22. Jagielski T, Van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J (2014) Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *BioMed Res Int*. Article ID 645802. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/645802>
23. Jang MH, Choi GE, Chang CL, Kim YD (2011) Characteristics of molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Korea. *Korean J Clin Microbiol* 14(2):41–47. <https://doi.org/10.5145/KJCM.2011.14.2.41> [CrossRefGoogle Scholar](#)
24. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35(4):907–914 [PubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)

25. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH (2003) Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol* 94(5):781–791. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01918.x> [CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
26. Kato-Maeda M, Metcalfe JZ, Flores L (2011) Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: application in epidemiologic studies. *Future Microbiol* 6(2):203–216. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.165> [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
27. Kim EY, Nahid P, Hopewell PC, Kato-Maeda M (2010) Novel hot spot of IS6110 insertion in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 48(4):1422–1424. <https://doi.org/10.1128/JCM.02210-09> [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
28. Koch R (1882) Die Ätiologie der Tuberkulose. *Berliner klinische Wochenschrift*, 15:428–445 <http://edoc.rki.de/documents/rk/508-428-445/PDF/428-445.pdf> Accessed 8 August 2017
29. Lee RS, Behr MA (2016) The implications of whole-genome sequencing in the control of tuberculosis. *Ther Adv Infect Dis* 3(2):47–62. <https://doi.org/10.1177/2049936115624630> [PubMedCrossRefGoogle Scholar](#)
30. Luo T, Yang C, Peng Y, Lu L, Sun G, Wu J, Jin X, Hong J, Li F, Mei J, DeRiemer K, Gao Q (2014) Whole-genome sequencing to detect recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in settings with a high burden of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 94(4):434–440. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.04.005> [CrossRefGoogle Scholar](#)
31. NHS National Health Service England (2015) Collaborative tuberculosis strategy for England 2015 to 2020. Public Health England. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/403231/Collaborative_TB_Strategy_for_England_2015_2020.pdf. Accessed 10 July 2017
32. Orduz, ML, Ribón W (2015) Molecular epidemiology of tuberculosis. In: Ribón W (ed) *Tuberculosis—expanding knowledge*, InTech, pp 44–64. doi: <https://doi.org/10.5772/59751>, *Molecular Epidemiology of Tuberculosis*
33. Ramos DF, Tavares L, da Silva PEA, Dellagostin OA (2014) Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: a review. *Braz J Microbiol* 45(2):657–660. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000045> [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
34. Rhee JT, Tanaka MM, Behr MA, Agasino CB, Paz EA, Hopewell PC, Small PM (2000) Use of multiple markers in population-based molecular epidemiologic studies of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 4(12):1111–1119 [PubMedGoogle Scholar](#)
35. Rozo-Anaya JC, Ribón W (2010) Molecular tools for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. *Rev Salud Publica (Bogota)* 12(3):510–521. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642010000300016> [CrossRefGoogle Scholar](#)
36. Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA (1994) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci* 91:2091–2094 [CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
37. Sankar S, Kuppanan S, Balakrishnan B, Nandagopal B (2011) Analysis of sequence diversity among IS6110 sequence of *Mycobacterium tuberculosis*: possible implications for PCR based detection. *Bioinformatics* 6(7):283–285. <https://doi.org/10.6026/97320630006283> [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
38. Siguier P, Pérochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M (2006) ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34(suppl_1):D32–D36 [CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
39. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM (1997) Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9869–9874 [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
40. Sun Z, Li W, Xu S, Huang H (2016) The discovery, function and development of the variable number tandem repeats in different *Mycobacterium* species. *Crit Rev Microbiol* 42(5):738–758 [PubMedGoogle Scholar](#)
41. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C (2001) Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39(10):3563–3571. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3563-3571.2001> [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
42. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T (1993) Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341:647–650. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90417-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90417-F) [CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

43. Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, van Soolingen D (2012) Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 18(4):653–655. <https://doi.org/10.3201/eid1804.110888> [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
44. WHO (2016) Global tuberculosis report 2016 http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. ISBN 978 92 4 156539 4 Accessed 9 February 2017
45. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, van Soolingen D, Rüsche-Gerdes S, Locht C, Brisse S, Meyer A, Supply P, Niemann S (2008) Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog* 4(9):e1000160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160> [CrossRefPubMedPubMedCentralGoogle Scholar](#)
46. Zhang J, Abadia E, Refregier G, Tafaj S, Boschirola ML, Guillard B, Andremont A, Ruimy R, Sola C (2010) *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *J Med Microbiol* 59:285–294. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.016949-0>

Genomic characterization of *Mycobacterium Tuberculosis* isolates From Czechia

Authors: Ibrahim Bitar^{1,2}, Matej Medvecký^{2,3}, Jana Amlerová^{1,2}, Costas Papagiannitsis^{1,2} and Jaroslav Hrabak^{1,2}.

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Plzen, Czech Republic, ²Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Plzen, Czech Republic, ³CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

Keywords: *Mycobacterium Tuberculosis*, WGS, MDR, XDR, Spoligotype

Received text in review process

Abstract

TB is considered one of the most fatal diseases worldwide with an estimation of 10.4 million cases with a mortality pilling up to 1.4 million people annually (WHO 2015). In this study, WGS was used to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Czech Republic to determine the genetic diversity as well as drug resistance profile. Forty isolates of *Mycobacterium tuberculosis* have been collected from different hospitals across the Czech Republic from 24-April-2005 till 18-May-2017. Susceptibility testing for first line drugs was performed. DNA was sequenced using Illumina MiSeq platform. SNPs detection and phylogenetic analysis was performed. Spoligotypes and mutations in antibiotic resistant genes were detected by uploading the paired end reads to an online database (<http://tbdr.lshtm.ac.uk/>).

The phylogenetic tree shows optimal separation of spoligotypes. Two samples belonged to lineage 1, five to lineage 2 and thirty-three to lineage 4. Samples showing phenotypic resistance to at least one drug were 12 to streptomycin, eleven to isoniazid, seven to rifampicin, six to ethambutol and five to pyrazinamide. On the other hand, there were 32 (80%) samples that had genomic resistant genes for at least one drug. Nevertheless, phenotypic resistance profiles did not match that of the genotypic in all cases. To our knowledge, this is the first study using this approach to be done in Czechia. Our results suggest that the most dominant lineage in our sample was lineages 4, however the presence of other lineage suggests that infections can be originated from different sources.

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), tuberculosis (TB) is considered one of the most fatal diseases worldwide with an estimation of 10.4 million cases with a mortality pilling up to 1.4 million people annually (WHO 2015) [1,2]. Active TB may have non specific clinical signs and

symptoms leading to delayed diagnosis, thus prolonged patient illness which in turn contributes to the spread of the disease not only among household members of the affected patient but also other individuals in the community upon frequent social contact [3]. Furthermore, there is a global increased rate of drug resistance among new cases; Prevalence of MDR-TB was 3.9% among new cases in 2015 worldwide and increasing with time [1].

Mycobacterium tuberculosis strains resistant to at least rifampicin and isoniazid are considered to be MDR-TB. Misidentification of such strains will lead to mistreatments that may result in the development of extensive drug resistant TB (XDR-TB), that is resistant to fluoroquinolones and at least one second line injectable drug, and finally to totally drug resistant TB (TDR-TB), that is resistant to first line drugs (FLDs) and second line drugs (SLDs) [4]. Patients suffer from difficult Clinical treatment of MDR-TB and also from an economical burden, as treatment can be expensive [5, 6].

Therefore, epidemiological investigations can be complicated and in case of an outbreak, it will be very difficult to trace the route of transmission, where unsuspected infected individuals will serve as a source of TB outbreaks [3]. This fact suggests the need for an extensive surveillance, developing molecular methods for early detection and establishment of health-care facilities specialized in a prevention of the spread of MDR-TB [1].

Currently, there are fast and low cost genomic assays used in routine diagnostics that screen for defined number of loci, which are associated with drug resistance [7]. Nevertheless those assays cannot identify resistance by other mechanisms as drug resistance mutations can be associated by compensatory mutations to compensate for the fitness cost by restoring affected physiological functions [8].

Whole genome sequencing (WGS) has a superior resolution over current diagnostic methods as it allows the detection of all known resistance mutations as well as other markers associated with the transmission. The method can be also use for a prediction of resistance to antituberculotics [7,9,10]. In this study, WGS was used to characterize *M. tuberculosis* isolates from the Czech Republic to determine the genetic diversity as well as drug resistance profile. To our knowledge, this is the first study using this approach to be done in the Czech Republic, which will provide an insight on the drug resistance circulating in this region and on the epidemiology of TB, which in turn will help to improve infection management and control in this country.

Materials and Methods:

Samples

A total of 40 samples of *M. tuberculosis* have been collected from different hospitals across the Czech Republic from the period of 24-April-2005 till 18-May-2017; twenty nine samples from the Department of Microbiology, Faculty of Medicine and *Mycobacterium Tuberculosis* in Czech

Hospitals University Hospital in Plzen, Charles University; seven samples 89 from the National Reference Laboratory for Mycobacteria, National Institute of Public Health Prague; and four samples from the Institute of Public Health in Brno. All the samples correspond to patients with acute tuberculosis (Lung TB in 39 and TB lymphadenitis in one), 36 of which correspond to sputum, three to bronchoalveolar lavage (BAL) and one to a tissue from the lymph node.

Sample processing

Samples decontamination was performed by N-acetyl-L-cysteine/NaOH (1% NaOH final concentration) method. The sediments were suspended in 3ml phosphate buffer (pH 6.8) and inoculated in BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, NV, USA) and on the Löwenstein-Jensen medium (Trios, Olomouc Czech Republic). Cultures were incubated at 37 °C and growth was checked on a weekly basis.

Genomic DNA extraction

Colonies were harvested from the cultured samples and suspended in Tris-HCL106 EDTA buffer and heated at 90°C for 2 hours, then frozen at -20. After thawing the tubes were vortexed briefly and centrifuged at 15,000g for 10 minutes. The supernatant was transferred to a new 1.5 Eppendorf tube for Genomic DNA Extraction using DNA-Sorb-B kit (Sacace Biotechnologies Srl, Como, Italy) according to the manufacture's instructions.

Phenotypic Resistance Profiling

Susceptibility testing for first line drugs was performed for all the samples. These include streptomycin (STRP), isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol (EMB) and pyrazinamide (PZA). The Drug susceptibility testing was performed using the automated BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson) according to the manufacture's instructions.

Whole Genome Sequencing; library preparation and Illumina sequencing: Multiplexed DNA libraries were prepared using Nextera XT Library preparation kit according to the manufacture instructions. The resulting 300-bp paired-end sequences were run on Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) using the MiSeq v3 600-cycle Reagent kit. Base calling and demultiplexing were performed as standard using the MiSeq machine producing paired FASTQ files per sample.

Sequence Analysis

Paired-end reads were trimmed to remove low quality sequence at the end of the reads using Trimmomatic tool v0.33 [11] with the sliding window size of 4 bp, required average base quality ≥ 17 and minimum read length of 48 bases.

SNP detection

High quality reads were mapped against *M. tuberculosis* H37Rv reference genome (GenBank accession NC_000962.3) using bowtie2 v2.3.4.2 [12]. Samtools v1.3.1 [13] was then applied for the format conversions and mpileup file construction. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were

called via VarScan v2.4.3 [14] with minimum read depth of 8, minimum base quality of 20 and variant allele frequency ≥ 0.8 . Moreover, we removed all the sites in which at least one sample had read *Mycobacterium Tuberculosis* in Czech Hospitals depth < 8 as well as sites from PE/PPE genes, integrases, 138 transposases or phage related genes as defined in [15].

Phylogenetic analysis

All filtered SNPs were concatenated and analysed by jModeltest v2.1.10 [16] to estimate best-fitting model of nucleotide substitution. GTR substitution model was determined as the best-fit under the Akaike information criterion and therefore used for maximum-likelihood (ML) analysis. ML tree topology was obtained using RAxML v8.2.10 [17] with 500 bootstrap replications. The tree topology was also inferred employing Bayesian statistics (Supplementary Fig. 1) as implemented in MrBayes v3.2.6 [18] using mixed model of nucleotide substitution, gamma₁₄₉ distributed rates among sites, two runs of four chains for 700 000 generations, sampling frequency of 1000 and the first 25 % of samples discarded as burn-in. The final topology was then generated using 50 % majority-rule consensus. Both final topologies, ML as well as Bayesian-inference based, were visualized via iTOL v4.2.3 [19] and edited by Inkscape v0.91 (www.inkscape.org).

Genotypic characterization

Spoligotypes and mutations in genes associated with antibiotic resistance were detected by uploading the paired end reads of each sample to a curated drug resistance database (<http://tbdr.lshtm.ac.uk/>) [20].

Results

A total of 40 samples, out of which 39 samples from diagnosed patients with pulmonary TB and one sample from patient with TB lymphadenitis were included in the study. The patients in the study included six females and 34 men, but most importantly, the patients belonged to different nationalities; 14 Romanian, 16 Czech, three Slovakian, three Vietnamese, two Bulgarian, one Latvian, and one Ukrainian.

Phylogeny and lineage

In total, we identified 27510 SNPs of which most belonged to *M. canettii* outgroup strain (SRA run accession ERR1336826). SNPs based phylogeny was constructed as mentioned above, and *in-silico* spoligotypes (Lineages) were detected. The phylogenetic tree shows optimal separation of spoligotypes (Figure 1). Two samples belonged to lineage 1, five samples to lineage 2 and 33 to lineage 4. Noteworthy, the nationality of the patient didn't have a positive relation in respect of spoligotypes; samples clustered within different lineages and clades independent of the patient nationality.

One strain designated as 98009 was classified into two different spoligotypes – 4.8 and 4.1.2.1. The strain was re-sequenced twice to make sure this discrepancy is not due to low coverage or

contamination. Nevertheless, *in-silico* spoligotypes results remained the same. Then, the mapped reads were checked manually for the presence of the spoligotype specific SNPs for both lineages. The mapped reads did not demonstrate 4.1.2.1 specific SNP (C107794T) [20] while informative SNP for lineage 4.8 (G3836739A) was clearly present in sequencing data. Thus, the sample belonged to 4.8 lineage which is in accordance with the results of phylogenetic analysis. The database curators were notified of the possible “bug” in the database.

Drug Resistance concordance between phenotype and genotype

Genetic and phenotypic profiles were detected and compared for all the samples. Phenotypic screening was done on all the isolates for streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol and pyrazinamide. Samples showing phenotypic resistance to at least one drug were 12 to streptomycin, 11 to isoniazid, seven to rifampicin, six to ethambutol and five to pyrazinamide. On the other hand, there were 32/40 (80%) samples that had genomic resistant genes for at least one drug. Resistance to streptomycin was 9/40 (23%), isoniazid 8/40 (20%), rifampicin 4/40 (10%), ethambutol 4/40 (10%), pyrazinamide 2/40 (5%), amikacin 1/40 (2.5%), capreomycin 1/40 (2.5%), kanamycin 2/40 (5%) and ethionamide 1/40 (2.5%) (Supplementary table S1).

Mutations specific for streptomycin resistance were identified in the locuses *gid* (Lys16Arg), *rpsl* (Lys43Arg), *rpsl* (Lys88Arg) and *rrs* (A1401G); for isoniazid, *katG* (Ser315Thr), *KatG* (Pro241Pro), *aphC* (C-81T promotor) and *fabG1* (C-15T promotor); for rifampicin, *rpoB* (Ser450Leu), *rpoB* (His445Arg) and *rpoB* (Asp435Val); for ethambutol, *embB* (Met306Val), *embB* (Met306Ile) and *embB* (Gly406Ala); for pyrazinamide, *pncA* (Val128Gly) and *pncA* (Tyr34Stop); For ethionamide one mutation was detected in the locus *fabG1* (C-15T promotor); For amikacin, capreomycin and kanamycin one mutation was common for all resistant strains, *rrs* (A1401G), with another mutation for kanamycin *eis* (G-12A promotor) (Table 1).

Nevertheless, phenotypic resistance profiles did not match that of the genotypic in all cases; for streptomycin; seven samples showed phenotypic resistance with no known mutations while four samples had mutation in the locus *gid* (Lys16Arg) but had a phenotypic susceptible profile. On the other hand, four samples matched the phenotypic and the genotypic resistance profiles; two having mutations in *rpsl* (Lys43Arg), one having mutation in *rpsl* (Lys88Arg) and one in *gid* (Lys16Arg). For isoniazid, only one sample was susceptible phenotypically but had the *aphC* (C- 81T promoter) mutation, while three samples showed phenotypically resistance with no known mutation. However, seven samples showed phenotypic and genomic resistance profiles, six having the mutation in *KatG* (Ser315Thr) and one sample having *fabG1* (C-15T promoter) mutation.

For rifampicin, three samples showed phenotypic resistance with no known mutation, one sample having the mutation His445Tyr, two samples that matched both profiles having mutation Ser450Leu and another two samples having asp435Val mutation in *rpoB*.

For ethambutol, two samples were phenotypically susceptible with the mutation in the locus *embB* (Met306Val) mutation, while four samples showed phenotypic resistance with no known mutation and two samples that confirmed phenotypic resistant with genomic resistance having mutations in *embB* – Gly406Ala and Met306Ile, respectively.

Finally, for pyrazinamide, three samples showed phenotypic resistance with no known mutation while two samples confirmed the phenotypic resistance through *pncA* (Val128Gly) and *pncA* (Tyr34STOP) mutations (supplementary table 1).

Discussion

WGS have been used more often since its first use for 238 *M. tuberculosis* in 1998. This approach provides a solid method for fast proper species identification, along with rapid genotyping and drug resistance profile detection [21]. In this study, five strains were MDR, two of them showing resistance not only against first line of drugs, but also to second line antituberculars, having resistance against at least seven drugs and more. The drug resistance in this study was diffused across different clades and lineages suggesting that there is limited drug resistance dissemination within the same clade.

The SNPs based phylogeny approach used in this study produced a tree that separated lineages and clades in concordance with the spoligotypes; this is important since no defined parameters and approaches for SNPs phylogeny generation that match spoligotypes is used in TB studies. MT genome is relatively conserved and stable; no recombination events and no horizontal drug resistance transfer, which means that this approach can be used as a standard for phylogeny generation [9].

For isoniazid, *katG* encodes for catalase-peroxidase, and the mutation Ser315Thr leads to high resistance level [22]; The seven isolates harboring this mutation showed phenotypic resistance as well. While *aphC* mutation in intergenic -81T promoter region, which encodes for alkyl hydro-reductase, was found to be phenotypically susceptible since this mutation confers low resistance level [23,24].

For rifampin, three types of mutations were identified in five samples, in which the mutations affected *rpoB* (Ser450Leu and Asp435Val and His445Tyr); *rpoB* encodes β subunit of the RNA polymerase. These mutations confer high resistance level for rifampicin due to its low fitness cost except to His445Tyr, which was phenotypically susceptible [25].

For ethambutol, all the mutations were detected in *embB* gene. It is a part of the *embCAB* operon that encodes for arabinosyl transferases. Arabinosyl transferases is involved in the biosynthesis of arabinogalactan and lipoarabinomannan, both of which are considered key structures of the mycobacterial cell wall [26]. However, two samples having *embB* (Met306Val) mutation had susceptible phenotypic profile; this can be explained by the fact that this mutation can lead to both low or high resistance levels, and in this cause it expressed low level resistance [27,28].

For streptomycin, mutations in *rpsL* gene (Lys43Arg and Lys88Arg), which codes for ribosomal protein S12, confer high resistance level, as the two samples having this mutation are phenotypically resistant [28]. While mutation in the gene *gidB* (Lys 16Arg), which encodes a 7-methylguanosine methyltransferase, can express both high and low resistance level [29]. This is evident in our samples having this mutation; four samples are phenotypically susceptible while one sample is resistant. Finally, seven samples were phenotypically resistant with no known mutations.

For pyrazinamide, two samples matched the phenotypic resistance with that of the genomic. The two detected mutations were *pncA* (Val128Gly) and *pncA* (Tyr34STOP), which confer high resistance level as, described elsewhere [30]. And finally three samples were phenotypically resistant with no known mutation.

The presence of phenotypically resistant profiles with 287 no known mutations has been reported in the literature. The discrepancies are normal due to the lack of complete genomic data that identify genetic resistance and the discovery of new mutations. And thus, highlighting the limitation of resistance detection through whole genome sequencing.

Conclusion

In summary, to our knowledge, this is the first epidemiological study for *M. tuberculosis* isolates from the Czech Republic using whole genome sequencing. Our results suggest limited drug resistance dissemination within the same clade since drug resistant isolates belonged to different clades. Moreover, the most dominant lineage in our sample was lineage 4, however the presence of other lineage suggests that infections can be originated from different sources.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

IB and JH played an important role in designing the experiments and in writing the manuscript. IB, MM, CP and JA carried out experimental work and data analysis. IB revised the final manuscript, which was approved by all authors.

Funding Statement

The study was supported by the National Sustainability Program LO1503, by the project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 „Fighting Infectious Diseases“, awarded by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, financed from The European Regional Development Fund and by the Charles University Research Fund Progres (project number Q39).

Acknowledgments

We would like to thank Jana Svobodova and Ilona Zemanova for providing us with samples from the Institute of Public Health in Brno and from the National Institute of Public Health in Prague respectively.

Ethical Review

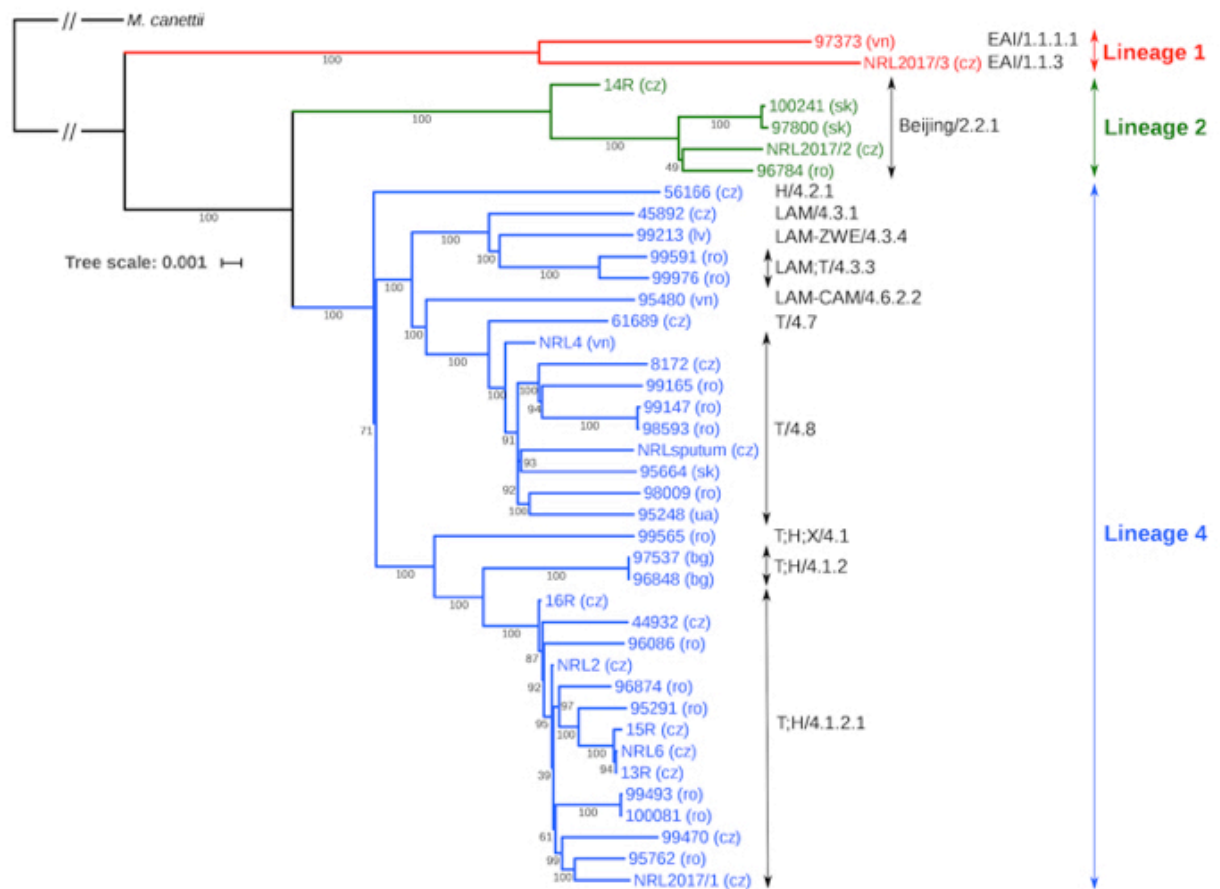
No ethical review was needed in this study, since only clinical samples are processed and no patient related information was revealed.

Table 1 – Genotypic drug resistance and mutations detected.

Drug	Mutation	Number	Percentage
Any resistance			
STM		9	23%
	gid (Lys16Arg)	4	
	rpsl (Lys43Arg)	3	
	rpsl (Lys88Arg)	1	
INH	rrs (A1401G)	1	
		8	20%
	katG (Ser315Thr)	5	
	KatG (Pro241Pro)	1	
RIF	ahpc (C-8iT promotor)	1	
	fabG1 (C-15T promotor)	1	
		4	10%
	rpoB (His445Arg)	1	
EMB	rpoB (Ser450Leu)	2	
	rpoB (Asp435Val)	1	
		4	10%
	embB (Met306Val)	2	
PZA	embB (Met306Ile)	1	
	embB (Gly406Ala)	1	
		2	5%
AMK	pncA (Val128Gly)	1	
	pncA (Tyr34Stop)	1	
CPR		1	1%
	rrs (A1401G)	1	
KAN		2	5%
	rrs (A1401G)	1	

Drug	Mutation	Number	Percentage
	eis (G-12A promotor)	1	
ETH		1	1%
	fabG ₁ (C-15T promotor)	1	
Mono-resistance		8	20%
STM		4	
	gid (Lys16Arg)	3	
	rpsL (Lys43Arg)	1	
INH		4	
	katG (Ser315Thr)	3	
	KatG (Pro241Pro)	1	
Non-MDR Poly-resistance		2	5%
INH+EMB	ahpc (C-81T promotor) + embB (Met306Val)	1	
STM+INH+EMB	rpsL(Lys43Arg)+ katG (Ser315Thr)+ embB (Met306Val)	1	
MDR		4	10%
STM+INH+RIF	gid (Lys16Arg)+ katG (Ser315Thr)+ rpoB (Asp435Val)	2	
STM+INH+RIF+EMB+PZA+ETH+KAN	abG ₁ (C-15T promoter) & katG (Ser315Thr)+ rpoB (Ser450Leu)+ embB (Gly406Ala)+ pncA (Tyr34Stop)+ fabG ₁ (C-15T promoter)+ eis (G-12A promoter)	1	
STM+INH+RIF+EMB+PZA+AMK+CPR+KAN	rpsL (Lys43Arg) & rrs (A1401G)+ katG (Ser315Thr)+ rpoB (Ser450Leu)+ embB (Met306Ile)+ pncA (Val128Gly)+ rrs (A1401G)+ rrs (A1401G)+ rrs (A1401G)	1	

Figure 1 – SNPs based phylogenetic tree of the 40 samples along with distribution of the spoligotypes. The 2 letters next to the sample name describes the relative patient nationality; Czech (cz), Romanian (ro), Bulgarian (bg), Slovakian (sk), Vietnamese (vn), Ukranian (ua) and Latvian (lv).



References

1. Tilahun M, Ameni G, Desta K, Zewude A, Yamuah L, Abebe M, et al. Molecular epidemiology and drug sensitivity pattern of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients in and around Ambo Town, Central Ethiopia. Plos One. 2018;13(2).
2. Somoskovi A, Salfinger M. Mycobacteria: Tuberculosis. In Antimicrobial Drug Resistance 2017 (pp. 1041-1059). Springer, Cham.
3. Merker M, Kohl TA, Niemann S, Supply P. The Evolution of Strain Typing in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In Strain Variation in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control 2017 (pp. 43-78). Springer, Cham.
4. Velayati AA, Farnia P, Hoffner S. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Epidemiology and role of morphological alterations. Journal of global antimicrobial resistance. 2018 Mar 1;12:192-6.
5. Weyer K, Dennis Falzon D, Jaramillo E, Zignol M, Mirzayev F, Raviglione M. Drug-resistant tuberculosis: what is the situation, what are the needs to roll it back. AMR control. 2017.
6. Manson AL, Cohen KA, Abeel T, Desjardins CA, Armstrong DT, Barry III CE, Brand J, Jureen P, Malinga L, Nordenberg D, Velayati AA. Genomic analysis of globally diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains provides insights into the emergence and spread of multidrug resistance. Nature genetics. 2017 Mar;49(3):395.
7. Walker TM, Kohl TA, Omar SV, Hedge J, Elias CD, Bradley P, Iqbal Z, Feuerriegel S, Niehaus KE, Wilson DJ, Clifton DA. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. The Lancet infectious diseases. 2015 Oct 1;15(10):1193-202.

8. Cohen KA, Abeel T, McGuire AM, Desjardins CA, Munsamy V, Shea TP, Walker BJ, Bantubani N, Almeida DV, Alvarado L, Chapman SB. Evolution of extensively drug-resistant tuberculosis over four decades: whole genome sequencing and dating analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KwaZulu-Natal. *PLoS medicine*. 2015 Sep 29;12(9):e1001880.
9. Brown AC, Bryant JM, Einer-Jensen K, Holdstock J, Houniet DT, Chan JZ, Depledge DP, Nikolayevskyy V, Broda A, Stone MJ, Christiansen MT. Rapid whole genome sequencing of *M. tuberculosis* directly from clinical samples. *Journal of clinical microbiology*. 2015 May 13;JCM-00486.
10. Kidenya BR, Mshana SE, Fitzgerald DW, Ocheretina O. Genotypic drug resistance using whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from North-western Tanzania. *Tuberculosis*. 2018 Mar 1;109:97-101.
11. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Apr 1;30(15):2114-20.
12. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*. 2012 Apr;9(4):357.
13. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078-9.
14. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, Wilson RK. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome research*. 2012 Feb 2.
15. Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, Ernst JD, Gagneux S. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nature genetics*. 2010 Jun;42(6):498.
16. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*. 2012 Aug;9(8):772.
17. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post393 analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014 May 1;30(9):1312-3.
18. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003 Aug 12;19(12):1572-4.
19. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic acids research*. 2016 Apr 19;44(W1):W242-5.
20. Coll F, McNerney R, Preston MD, Guerra-Assunção JA, Warry A, Hill-Cawthorne G, Mallard K, Nair M, Miranda A, Alves A, Perdigão J. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome medicine*. 2015 Dec;7(1):51.
21. Amlerova J, Bitar I, Hrabak J. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using whole genome sequencing. *Folia microbiologica*. 2018 Mar 17:1-9.
22. Tseng ST, Tai CH, Li CR, Lin CF, Shi ZY. The mutations of katG and inhA genes of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2015 Jun 1;48(3):249-55.
23. Taniguchi H. Molecular mechanisms of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of UOEH*. 2000 Sep;22(3):269-82.
24. Lempens P, Meehan CJ, Vandelanoot K, Fissette K, de Rijk P, Van Deun A, Rigouts L, de Jong BC. Isoniazid resistance levels of *Mycobacterium tuberculosis* can largely be predicted by high-confidence 413 resistance-conferring mutations. *Scientific reports*. 2018 Feb 19;8(1):3246.
25. Sun LL, Aye KS, Aye TO, Shwe MM, Fukushima Y, Gordon SV, Suzuki Y, Nakajima C. Insight into multidrug-resistant Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar. *International Journal of Infectious Diseases*. 2018 Nov 1;76:109-19.
26. Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics* 3: 317-340.
27. Plinke C, Walter K, Aly S, Ehlers S, Niemann S. *Mycobacterium tuberculosis* embB306 mutations confer moderately increased resistance to Ethambutol in vitro and in vivo. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Mar 28.
28. Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan XI, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR, Telenti A, Musser JM. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997 Aug 1;41(8):1677-81.

29. Johnson R, Streicher EM, Louw GE, Warren RM, Van Helden PD, Victor TC. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Current issues in molecular biology*. 2006 Jul;8(2):97-112.
30. Ruesen C, Riza AL, Florescu A, Chaidir L, Editoiu C, Aalders N, Nicolosu D, Grecu V, Ioana M, van Crevel R, van Ingen J. Linking minimum inhibitory concentrations to whole genome sequence-predicted drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from Romania. *Scientific reports*. 2018 Jun 26;8(1):9676.

ECCMID 2017 Vídeň: P1670 Molecular-epidemiological characteristics of antituberculous-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates identified in West Bohemian region of the Czech Republic

J. Amlerova* (Plzen, Czech Republic), D. Kralova, K. Chudejova, J. Hrabak

Background

Tuberculosis is recognized as one of the main epidemiological issue all over the world. In the Czech Republic, the incidence ranges from 6 to 9 new cases per 100 000 inhabitants with the decreasing trend. In the recent years, however, cases of antituberculous-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* have been reported. The aim of this study was to characterize resistant isolates identified in West Bohemian region of the Czech Republic.

Material/methods

Eighteen rifampin-resistant and 19 isoniazid-resistant strains of *M. tuberculosis* were included in the study. The genes encoded for antituberculous targets (*rpoB*, *inhA*, *ethA*, and *katG*) were amplified and sequenced. Selected strains (n=15) were subjected for whole-genome sequencing using Illumina MiSeq platform. DNA library was prepared by Nextera XT kit (Illumina).

Results

Among 37 resistant isolates, 20 were also resistant to streptomycin, 9 to ethambutol, and seven to pyrazinamide. Four isolates were resistant to all mentioned antituberculous (RIF, STM, EMB, INH, and PZA). Most of the resistant strains (n=22) were isolated from foreigners working in the Czech Republic. In majority of rifampin-resistant isolates (n=11), mutation in *rpoB* 531 codon was detected. Mutations in other codons were detected in low frequency. Based on the results from whole-genome sequencing, majority of resistant strains were related to the clones previously identified in Russia.

Conclusions

To our knowledge, this is the first study focused on molecular-epidemiological description of resistant *M. tuberculosis* in the Czech Republic. Data from whole-genome sequencing also demonstrate trans-borderline spread of resistant strains of *M. tuberculosis*. Sequencing of control group of susceptible isolates is ongoing.

ECCMID 2019 Amsterdam: P0961 Genomic characterization of *Mycobacterium Tuberculosis* isolates From Czechia

Bitar Ibrahim^{*1,2}, Medvecký Matej^{1,3}, Amlerová Jana², Papagiannitsis Costas¹ and Hrabák Jaroslav^{1,2}.

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine and University Hospital in Plzeň, Charles University, Plzeň, Czechia; ²Faculty of Medicine, Biomedical Center, Charles University, Plzeň, Czechia; ³CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic.

Background

According to the World Health Organization (WHO), TB is considered one of the most fatal diseases worldwide with an estimation of 10.4 million cases with a mortality piling up to 1.4 million cases (WHO 2015). In this study, WGS was used to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Czechia to determine the genetic diversity as well as drug resistance profile.

Materials/methods

A total of 40 samples of *Mycobacterium tuberculosis* have been collected from different hospitals across Czechia from the period of 24-April-2005 till 18-May-2017. Susceptibility testing for first line drugs was performed for all the samples. Multiplexed DNA libraries were prepared using Nextera XT Library preparation kit and sequenced using Illumina MiSeq platform. SNPs were detected and phylogenetic analysis was performed. Spoligotypes and mutations in genes associated with antibiotic resistance were detected by uploading the paired end reads to a curated drug resistance database (<http://tbdr.lshtm.ac.uk/>).

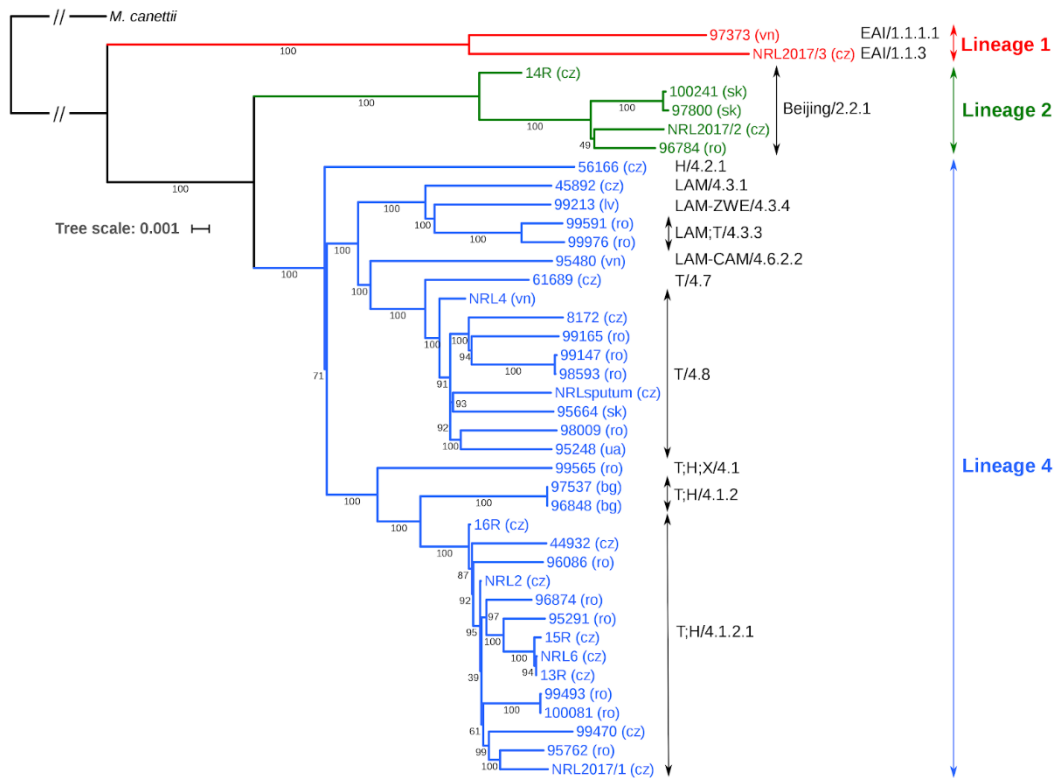
Results

The phylogenetic tree shows optimal separation of spoligotypes (Figure 1). 2 samples belonged to lineage 1, 5 samples to lineage 2 and 33 to lineage 4. Noteworthy, the nationality of the patient didn't have a positive relation in respect of spoligotypes; samples clustered within different lineages and clades independent of the patient nationality. Samples showing phenotypic resistance to at least one drug were 12 to streptomycin, 11 to isoniazid, 7 to rifampicin, 6 to ethambutol and 5 to pyrazinamide. On the other hand, there were 32/40 (80%) samples that had genomic resistant genes for at least one drug. Resistance to streptomycin was 9/40 (23%), isoniazid 8/40 (20%), rifampicin 4/40 (10%), ethambutol 4/40 (10%), pyrazinamide 2/40 (5%), amikacin 1/40 (2.5%), capreomycin 1/40 (2.5%), kanamycin 2/40 (5%) and ethionamide 1/40 (2.5%). Moreover, 5 strains showed resistance to e antibiotics or more. Nevertheless, phenotypic resistance profiles did not match that of the genotypic in all cases.

Conclusions

To our knowledge, this is the first study using this approach to be done in Czechia, which will provide an insight on the drug resistance circulating in this region. Our results suggest limited drug resistance dissemination within the same clade. Moreover, the most dominant lineage in our sample was lineage 4, however the presence of other lineages suggests that infections can be originated from different sources.

Key words: *Mycobacterium Tuberculosis*, WGS, MDR, XDR



Seznam publikací souvisejících s tematikou dizertační práce

1. Bitar I, Medvecký M, **Amlerová J**, Papagiannitsis K, Hrabák J. Genomic characterization of *Mycobacterium Tuberculosis* isolates From Czechia; Received text in review process
2. **Amlerová J**, Bitar I, Hrabák J. 2018. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using whole genome sequencing. *Folia Microbiologica*, Volume 63, Issue 5, pp 537-545
3. Alcaide F, **Amlerová J**, Bou G, Ceyssens PJ, Coll P, Corcoran D, Fangous MS, Gonzalez-Alvarez I, Gorton R, Greub G, Hery-Arnaud G, Hrabák J, Ingebretsen A, Lucey B, Marekovic I, Mediavilla-Gradolph C, Monte MR, O'Connor J, O'Mahony J, Opota O, O'Reilly B, Orth-Holler D, Oviano M, Palacios JJ, Palop B, Pránada AB, Quiroga L, Rodríguez-Temporal D, Ruiz-Serrano MJ, Tundo G, Van den Bossche A, van Ingen J, Rodríguez-Sánchez B. 2017. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2018 Jun;24(6):599-603. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.012. 2017 Nov 22., <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.012>
4. **Amlerová J**, Epidemiologické a laboratorní aspekty dětských mykobakteriálních onemocnění. 2018. *Vox paediatricae*. 2018, Roč. 18, č. 3, s. 18-20, ISSN 1213-2241
5. **Amlerová J**, Hrabák J. 2016. IGRA metody v rutinním provozu – QuantiFERON®-TB Gold nebo T-SPOT.TB? *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol*. 65, č. 4, s. 246-248
6. **Amlerová J**, Študentová V, Hrabák J. 2014. Identifikace izolátů *Mycobacterium* spp. pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol*. 63, č. 3, s. 195-198

Seznam publikací mimo téma disertační práce

1. Sykora J, Valeckova K, **Amlerova J**, Siala K, Dedek P, Watkons S, Varvarovska J, Stozicky F, Pazdiopra P, Schwarz J. 2005. Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. *J Clin Gastroenterol.* Sep;39(8):692-8., ISSN 0192-0790.
2. Sýkora J, Valečková K, **Amlerová J**, Siala K, Varvařovská J, Dědek P, Stožický F, Schwarz J. 2004. Supplements of One Week Triple Drug Therapy with Special Probiotic *Lactobacillus Casei Imunitass* (Strain DN-114 000) and *Streptococcus Thermophilus* and *Lactobacillus Bulgaricus* in the Eradication of *H. Pylori*-Colonized Children: A Prospective Randomised Trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*//2.078, roč. 39, č. Suppl.1, s. S400-S400
3. Sýkora J, Valečková K, **Amlerová J**, Siala K, Watkins S, Varvařovská J, Dědek P, Schwarz, J. 2004. Omeprazole based triple therapy with amoxicillin and clarithromycine supplemented with fermented milk containing special probiotic (*Lactobacillus casei* DN-114 001) in the eradication of *H. pylori* colonized children:a prospective randomised controlled trial. *Helicobacter*//2.624, roč. 9, č. 5, s. 550-550
4. Sýkora J, Valečková K, **Amlerová J**, Siala K, Dědek P, Watkins S, Varvařovská J, Stožický F, Schwarz, J. 2004. Supplement of One Week Triple Therapy with Probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 in the Eradication of *H. pylori* – Colonized Children: A Prospective Randomised Trial. *Pediatric Gastroenterology* 2004: report from the 2nd World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Monduzzi Editore, Bologna, s. 553-558

Prezentace na kongresech

1. Bitar I, Medvecký M, **Amlerova J**, Papagiannitsis C, Hrabak J. Genomic characterization of *Mycobacterium Tuberculosis* isolates From Czechia, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2019 Amsterdam 13.-16. april, P0961
2. **Amlerova J**, Rychlerostoucí mykobaktéria – co s nimi v klinické praxi? IV. Kongres ČPFS a XXVI. Pneumoonkologické dny. Plzeň 2018, 8.-10. listopadu
3. **Amlerova J**, Hrabák J, Bitar I, Medvecký M, Celogenomová sekvenace *Mycobacterium tuberculosis* – budoucnost v epidemiologii tuberkulózy. 28. Pečenkovy epidemiologické dny. České Budějovice 2018, 12.-14. září
4. **Amlerova J**, Kralova D, Chudejova K, Hrabak J. Molecular-epidemiological characteristics of antituberculous-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates identified in West Bohemian region of the Czech Republic, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2017 Vídeň, 22.-25. april, P1670
5. **Amlerova J**, **Hrabák J**. Změní přítomnost cizinců incidenci tuberkulózy v ČR?, Kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie – KMINE 2017. Praha, 25.-27. října 2017
6. **Amlerová J**, Mykobakteriální infekce v ČR a jejich laboratorní diagnostika. In: Plzeňský lékařský sborník. Supplementum. Postgraduální lékařské dny. Plzeň 2016. – ISSN 0139-603X. Roč. 2016, Suppl. 86 (2016), s. 125
7. **Amlerová J**, Migrace a tuberkulóza. 27. Pečenkovy epidemiologické dny. Olomouc, 2016, 21.-23. září
8. **Amlerová J**, Využití IGRA testů v nepřímé diagnostice tuberkulózy. In: Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. Kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie – KMINE 2015. Špindlerův Mlýn, 23.-25. září 2015. – ISSN 1211-264X. – Roč. 21, č. 3 (2015), s. 104
9. **Amlerová J**, Bakteriologická ověření tuberkulózy – význam, úskalí a opatření. 26. Pečenkovy epidemiologické dny. Luhačovice 2014, 16. – 18. září
10. **Amlerová J**, Heringová v, Hrabák J, Identifikace *Mycobacterium* species pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, Kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie, Olomouc 2013, 17. – 19. října
11. **Amlerová J**, IGRA metody z pohledu mikrobiologa. In: XVII. kongres České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti. – ISBN 978-80-87118-04-7. – Supl. (2011), s. 69
12. **Amlerová J**, QuantiFERON-TB Gold In Tube – zkušenosti a výsledky v jednotlivých indikačních skupinách, Kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie – KMINE 2011. Plzeň 2011, 21.-23. září. 2011
13. **Amlerova J**, Bergerova T, Cervena D, Hrabak J. Mutations in rpoB gene in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates identified in the West-Bohemian region of the Czech Republic, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2010 Vienna 10.-13. april, P2045