

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**ATYPICKÉ MYKOBAKTERIE
ZPŮSOBUJÍCÍ ONEMOCNĚNÍ ČLOVĚKA**

Bc. LENKA KRÁLÍKOVÁ

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, rychlé rady, pomoc při jejím zpracování a konzultace. Také bych chtěla poděkovat paní Ing. Janě Vackové za spolupráci a pomoc v laboratoři. Poděkování také patří pracovníkům katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy za poskytnutí látek. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem mým nejbližším, kteří mě při studiu podporovali.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15.08.2021

.....

Obsah

1. ABSTRAKT	6
2. ABSTRACT	7
3. ÚVOD.....	8
4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	9
5. TEORETICKÁ ČÁST	10
5.1 Obecná charakteristika rodu <i>Mycobacterium</i>	10
5.2 Historie.....	11
5.3 Buněčná stěna mykobakterií	12
5.4 Členění mykobakterií	14
5.4.1 NTM charakteristika a třídění do skupin	14
5.5 Epidemiologie NTM	18
5.5.1 Ve světě.....	18
5.5.2 V České republice	21
5.6 Klinický význam mykobakterií.....	22
5.6.1 Lymfadenitidy	23
5.6.2 Kožní léze.....	24
5.6.3 Plicní onemocnění.....	30
5.6.4 Diseminované onemocnění	36
5.7 Diagnostika	37
5.7.1 Dekontaminace vzorku.....	38
5.7.2 Mikroskopie	40
5.7.3 Kultivace	43
5.7.4 Identifikace jednotlivých druhů NTM	44
5.7.5 Testování citlivosti.....	48
5.8 Rezistence	51
5.8.1 Buněčná stěna, poriny a efluxní pumpy.....	51
5.8.2 Biotransformace uvnitř bakterie.....	52
5.8.3 Indukovaná rezistence	52
5.9 Terapie.....	53
5.9.1 Nové terapeutické látky.....	55

6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	57
6.1	Mikrodiluční bujónová metoda	57
6.2	Testovací kmeny	58
6.2.1	<i>Mycobacterium aurum</i>	58
6.2.2	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	59
6.2.3	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Ra</i>	60
6.3	Testované látky	61
6.4	Laboratorní vybavení	81
6.4.1	Přístroje	81
6.4.2	Pomůcky	81
6.4.3	Chemikálie	81
6.5	Postup testování	82
6.5.1	Příprava látek	82
6.5.2	Příprava roztoků v bujónu	82
6.5.3	Příprava destičky	83
6.5.4	Pipetování látek	83
6.5.5	Příprava mykobakteriální suspenze	83
6.5.6	Inkubace	84
6.5.7	Hodnocení	85
6.6	Výsledky	86
7.	DISKUSE	94
8.	ZÁVĚR	100
9.	POUŽITÉ ZKRATKY	101
10.	SEZNAM TABULEK	104
11.	SEZNAM GRAFŮ	105
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ	106
13.	POUŽITÁ LITERATURA	108

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Autor: Bc. Lenka Králíková

Vedoucí práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Název diplomové práce: Atypické mykobakterie způsobující onemocnění člověka

Cílem této diplomové práce je shrnout historii výskytu mykobakterií, jejich členění, epidemiologii netuberkulózních onemocnění, klinický význam, diagnostiku, rezistence a možnosti terapie. V rámci epidemiologie je porovnáván způsob zvládnutí tuberkulózy a netuberkulózních mykobakterióz.

Mykobakteriózy jsou vzácná onemocnění, jejich incidence se s rostoucím počtem imunokompromitovaných pacientů pozvolna zvětšuje. Na základě místa infekce je dělíme na lymfadenitidy, kožní léze, plicní onemocnění a diseminované infekce. Nejčastěji izolovanými původci onemocnění jsou *Mycobacterium avium* komplex (MAC), *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium marinum* a *Mycobacterium kansasii*.

V experimentální části se práce zabývá antimykobakteriální účinností nově syntetizovaných sloučenin, které by mohly v budoucnost najít uplatnění v léčbě tuberkulózy a jiných mykobakterióz. Testování látek bylo provedeno na kmenech rodu *Mycobacterium* (*M. smegmatis*, *M. aurum* a *M. tuberculosis* H37Ra) pomocí mikrodiluční bujónové metody. V práci je uvedeno vyhodnocení výsledků měření a jejich interpretace z hlediska vztahu účinnosti a struktury testovaných sloučenin.

Testované látky byly rozděleny do šesti skupin na základě jejich struktury. Celkem bylo testováno 88 sloučenin, z kterých celkem 20 látek projevilo antimykobakteriální účinnost. Skupinou látek, která jeví největší potenciál, jsou deriváty thiazolidinu. Nejvýhodnějšími substituenty, které ovlivňují antimikrobiální aktivitu, jsou pravděpodobně chlor, *tert*-butyl a případně hydroxy skupina.

Klíčová slova: Mykobakterie, Mykobakteriózy, Antimykobakteriálně působící sloučeniny, Mikrodiluční bujónová metoda, Minimální inhibiční koncentrace

2. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Specialist on Laboratory Methods

Author: Bc. Lenka Králíková

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Title of diploma: Atypical mycobacteria as causative agents of human diseases

The aim of this diploma thesis is to summarize the history of mycobacteria, their classification, epidemiology of nontuberculous infections, clinical significance, diagnosis, resistance, and treatment options. Within the epidemiology, the way of managing tuberculosis and non-tuberculous mycobacterioses is compared.

Mycobacterioses are rare diseases, which incidence is gradually increasing with the increasing number of immunocompromised patients. Based on the spot of infection, we divide them into lymphadenitis, skin lesions, lung disease and disseminated infections. The most frequently isolated pathogens are *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium kansasii*.

The experimental part is devoted to the antimycobacterial activity of newly synthesized compounds, which could find application in the future in the treatment of tuberculosis and other mycobacterioses. Substance testing was performed on strains of the genus *Mycobacterium* (*M. smegmatis*, *M. aurum* and *M. tuberculosis* H37Ra) using the microdilution broth method. The thesis presents the evaluation of the obtained results and their interpretation in order to determine relationship between activity and structure of tested compounds.

The tested substances were divided into six groups, based on their structure. A total of 88 compounds were tested, of which a total of 20 substances showed antimicrobial activity. The group of substances, that show the biggest potential, are thiazolidine derivatives. The substituents that were likely to positively affect antimicrobial activity were probably chlorine, *tert*-butyl and hydroxy group.

Key words: Mycobacteria, Mycobacterioses, Antimycobacterial drugs, Microdilution broth method, Minimum inhibition concentration

3. ÚVOD

Výskyt a všudypřítomnost atypických mykobakterií jsou známá již od dob starověku. V posledních letech se zvyšuje incidence onemocnění, které způsobují. Vzhledem k velkému množství a variabilitě účinků na lidský organismus mohou být spící hrozbou, která čeká na správný okamžik, než zaútočí. V mnoha případech, kdy za infekci může právě netuberkulózní mykobakterie, nedojde k okamžitému odhalení. Je to kvůli tomu, že se zkrátka na mykobakterie jako takové nepomýšlí.

Oproti *Mycobacterium tuberculosis* nejsou netuberkulózní mykobakterie monitorované. V případě výskytu *Mycobacterium tuberculosis* jsou evidované jednotlivé příklady a podléhají hlášení. Zároveň každoročně vychází zpráva Světové zdravotnické organizace (WHO) o stavu a zvládnání problematiky výskytu tuberkulózy. Naopak z důvodu nedostatečného monitorování jednotlivých případů mykobakterií je obtížné vést přesnou dokumentaci výskytu. I přesto se některé země jako například Velká Británie, Slovensko nebo Česká republika rozhodly výskyt mykobakterií monitorovat. Například ve Velké Británii byl mezi lety 2007–2012 pozorován vzestupný trend pulmonálních onemocnění způsobených *Mycobacterium avium* komplex. Na Slovensku se mezi lety 2010–2015 zvýšil výskyt *Mycobacterium gordonae*, který je kontaminantem pitné vody. V České republice byla v letech 2016–2019 nejčastěji z netuberkulózních mykobakterií izolována *Mycobacterium avium* komplex, stejně jako ve Velké Británii. (Prevots, 2017; Shah, 2016; Provazník, 2016; WHO, 2020; ÚZIS, 2019; ÚZIS, 2018)

Nejznámější mykobakterií stále zůstává *M. tuberculosis*. Právě nebezpečí, které tuberkulóza představuje, má za následek rozvoj a snahu najít nová léčiva. Vzhledem k tomu, že netuberkulózní mykobakterie mají v mnoha ohledech podobné vlastnosti, dají se na jimi způsobené nemoci použít známá antituberkulotika. Problémem se stává, stejně jako u *M. tuberculosis*, vznikající rezistence některých kmenů na základní léky. Proto je důležité neustále vyvíjet nová léčiva a snažit se dodržovat základy prevence před rozvojem rezistence.

Hlavním krokem k ochraně před rozvojem rezistence je testování citlivosti infekčního kmene k antibiotikům. Pokud je tento test proveden, snižuje se rapidně u nemocného možnost selhání terapie *in vivo* a pacient není vystaven hrozbě rozvoje rezistence u tohoto kmene a následnému prodloužení nemoci a léčby.

4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této práce je zpracování rešerše týkající se netuberkulózních mykobakterií a nemocí, které způsobují u lidí. Informace shrnují diagnostiku onemocnění, jednotlivé mykobakterie a jimi způsobená onemocnění včetně možností léčby. Další kapitolu tvoří epidemiologická data ze světa i ČR.

Experimentální část této diplomové práce je věnována *in vitro* testování antimikrobní aktivity nových potencionální antituberkulotik na rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium* – *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium aurum* a avirulentním kmenu *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Testování je provedeno s využitím mikrodiluční bujónové metody vycházející ze standardů EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), pomocí které je stanovena minimální inhibiční koncentrace. V závěru jsou vyhodnoceny získané výsledky.

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Obecná charakteristika rodu *Mycobacterium*

Mykobakterie jsou ubikvitní, aerobní, nepohyblivé a nesporulující tyčky. Bývají zařazovány mezi grampozitivní bakterie, přestože jsou touto metodou ve většině případů nebarvitelné. Název mykobakterie (houba – bakterie) vznikl kvůli vzhledové podobnosti houbám při růstu v tekutém médiu, které se používá pro jejich kultivaci. S houbami nemají ovšem nic společného. Předpona „myko-“, poukazuje na přítomnost velkého množství vosků v buněčné stěně s dlouhými větvenými řetězci mykolových kyselin. (Bednář, 1996; Greenwood, 1999)

Mykobakterie se řadí do velmi heterogenního kmene aktinomycet. Řád *Actinomycetales* se v průběhu let stále rozvíjel, rozšiřoval a dodnes není jeho vývoj zcela ukončen. Celkem je řád členěn do sedmnácti podřádů. Příbuznost mezi jednotlivými podřády, zařazenými do této skupiny, je vzdálená. Podobným znakem, kterým tato skupina disponuje, je například struktura jejich stěny, respektive přítomnost některých charakteristických nelipidových složek tzv. chemotypů, viz tabulka č.1. (Julák, 2015; Forbes, 2017)

Tabulka 1 - Chemotypizace acidorezistentních a příbuzných bakterií

Stěnový chemotyp	Charakteristické nelipidové složky stěny	Typické taxony
I	L-DAP, glycin	<i>Streptomyces</i>
IIIA	meso-DAP, maduróza	<i>Actinomadura</i>
IIIB	meso-DAP	<i>Nocardiosis</i>
IV	meso-DAP, arabinóza, galaktóza	<i>Mycobacterium, Corynebacterium, Rhodococcus, Nocardia, Pseudonocardia, Saccharomonospora, Bacterionema, Saccharopolysphora, aj.</i>
VI	lysin, kyselina asparagová, galaktóza	<i>Rothia, Oerskovia</i>

meso-DAP, L-DAP – izomery diaminopimelové kyseliny

(zdroj: Julák, 2015)

5.2 Historie

Dle některých hypotéz se rod *Mycobacterium* objevil již před 150 miliony lety. Jedním z důkazů, že se zde tento rod vyskytuje již dlouhou dobu, jsou nálezy na egyptských mumiích z roku 2400 př. n. l., kdy na kostech mumií byly objeveny anomálie, které jsou charakteristické pro tuberkulózu. V egyptských záznamech jsou zakresleny obrazce vypovídající o Pottově nemoci a dalších abnormalitách, které jsou pro tuberkulózu typické. V egyptských papýrech nicméně nejsou záznamy o tuberkuloidních lézích. První psané důkazy o těchto lézích pocházejí z doby před 3300 a 2300 lety, a to konkrétně z oblasti Indie a Číny. (Barberis, 2017; Daniel, 2006)

Další zaznamenané údaje o výskytu tuberkulózy pocházejí z antického Řecka a Římské říše. Ve 12. století byla Williamem z Malmesbury doporučena léčba tuberkulózy zahrnující návštěvy královských hrobek, dotek králů nebo použití talismanů z mince. Léčba dotekem králů se používala až do roku 1712 v Anglii a ve Francii do roku 1825. Přesný patologický a anatomický popis nemoci byl poprvé ilustrován v roce 1679 Francísem Sylviem v jeho práci *Opera medica*. (Barberis, 2017)

V 18. století propukla v západní Evropě epidemie, při které byla úmrtnost 900 000 mrtvých na 100 000 obyvatel za rok. Nemoc se více vyskytovala mezi mladými lidmi, a proto se jí také přezdívalo „zloděj mládí“. (Barberis, 2017; Daniel, 2006)

V průběhu následujících let došlo k aktivnímu zkoumání patogenity, patogeneze, klinických projevů a terapie. V roce 1867 se jako mezi prvními vědci pokusil Theodor Albrecht Edwin Klebs izolovat mykobakterii na vaječný bílek uložený ve sterilních baňkách. Materiál hodně rychle zplesnivěl a bacily bylo nemožné prokázat. Známý vědec Robert Koch byl jako první schopný izolovat původce tuberkulózy. Tento svůj objev představil 24. března 1882 Fyziologické společnosti v Berlíně, čímž nastavil milník v boji s tuberkulózou. Koch v roce 1905 za své objevy a vědecké výsledky získal Nobelovu cenu. V následujících desetiletích byl vyvinut tuberkulinový kožní test, streptomycin a další antituberkulotické léky. (Barberis, 2017; Daniel, 2006)

V 90. letech 19. století byl v laboratoři popsán mikroorganismus, který byl vzdáleně příbuzný a trochu jiný než do té doby známé *M. tuberculosis*. Tento mikroorganismus byl poté pojmenován jako *Mycobacterium avium*, jehož název byl odvozen od anglického pojmenování avian – pták, ptačí. Hlavním důvodem, proč se tento

kmen takto jmenuje je to, že se objevil poprvé u slepic. Slepice nakažené touto bakterií trpěly nemocí, která se podobala lidské tuberkulóze. Zpočátku se předpokládalo, že nákaza jiným kmenem, než je kmen *Mycobacterium tuberculosis*, není u člověka možná. Tato hypotéza byla vyloučena v roce 1934, když byl popsán jeden z prvních případů onemocnění plic, který byl způsoben *Mycobacterium avium*. (Kubica)

Od začátku tohoto tisíciletí bylo objeveno velké množství nových druhů mykobakterií. V roce 1999 patřilo do rodu čeledi *Mycobacteriaceae* osmdesát druhů. Do roku 2004 přibylo dalších patnáct a v roce 2005 bylo uznáváno sto patnáct druhů. V roce 2017 bylo známých již sto osmdesát osm druhů mykobakterií spadajících do rodu *Mycobacterium*. V roce 2018 byla čeleď *Mycobacteriaceae* nově rozdělena na pět rodů: *Mycolicibacterium*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus*, *Mycobacteroides* a *Mycobacterium*. Způsob, kterým bylo nové přerozdělení provedeno, spočívá na sekvenaci celého genomu a jejich následné porovnání. To odhalilo čtyři další různé rody uvnitř rodu *Mycobacterium*, které přibližně odpovídají mnoha již dříve popsaným komplexům. (Julák, 2015; Bednář, 1996; Forbes, 2017; Meehan, 2021)

5.3 Buněčná stěna mykobakterií

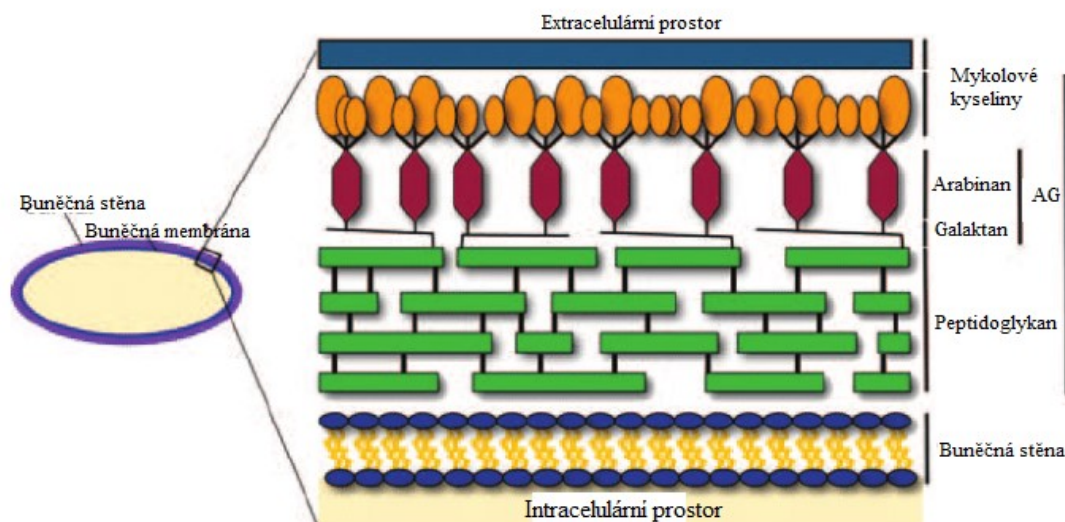
Vysoká odolnost a schopnost přežití mykobakterií je dána jejich buněčnou stěnou. Složení a struktura buněčné stěny mykobakterií je hlavním určujícím činitelem pro růstové, fyziologické, virulentní a ekologické vlastnosti netuberkulózních mykobakterií (NTM). Buněčná stěna mykobakterií se skládá z vnější vrstvy, obrovského tripartitního komplexu složeného z mykomembrány, arabino-galaktanu (AG) a peptidoglykanu. (Pereira, 2020).

Mykomembrána je složena převážně z mykolových kyselin, tj. „dlouhých“ 3-hydroxy-2 rozvětvených mastných kyselin. Tyto mykolové kyseliny jsou na vnitřní straně kovalentně navázané na arabinogalaktan, který je následně kovalentně vázaný na peptidoglykan. Vzniklé řetězce mykolových kyselin jsou potom vmezeřené dovnitř cytoplazmatické membrány způsobem připomínající zip, dlouhé mykolové kyseliny jsou složeny do tvaru ω . Vnější strana mykomembrány je složena z fosfolipidů, mykolátů, trehalózy, glykopeptidolipidů a lipoglykanů. (Bednář, 1996; Julák, 2015; Pereira, 2020)

Peptidoglykan se u většiny mykobakterií skládá z kyseliny *N*-acetylmuramové a *N*-glykolylmuramové. Přítomnost kyseliny *N*-glykolylmuramové zvyšuje odolnost vůči

lysozymu. Fragментy peptidoglykanu se podílejí na buněčné signalizaci, díky které může dojít k oživení spící mykobakterie. Peptidoglykan i jeho fragmenty jsou rozpoznávány v těle hostitele a jsou prvními, co spouští *toll*-like receptory přítomné na povrchu buňky nebo na lysozomu. Jakékoli změny ve struktuře peptidoglykanu mají za následek sníženou nebo žádnou reakci imunitního systému hostitele. (Pereira, 2020)

Na povrchu buňky se nacházejí poriny, které umožňují importovat nezbytné živiny pro jejich přežití. Množství porinů je mnohem menší než u gramnegativních bakterií. Nejlépe popsaným a detailně prostudovaným porinem je MspA u *Mycobacterium smegmatis*. U *M. tuberculosis* je popsán porin OmpA, u něj se ovšem pochybuje, zda se jedná o porin nebo transmembránový kanál. Jednotlivé vrstvy buněčné stěny jsou vyobrazeny na obrázku č.1. (Pereira, 2020; Van Ingen, 2012)



Obrázek 1 - Diagram základních komponent buněčné stěny mykobakterií (AG – arabino-galaktan) (převzato a upraveno Hett, 2008)

Vnější vrstva může obsahovat několik složek, které se mění dle druhu mykobakterie. Například u *M. leprae* a *M. lepraemurium* je vrstva složená z fenolických glykolipidů a glykopeptidolipidů, u *M. tuberculosis* je vrstva složená převážně z polysacharidů (glukan a D-arabino-D-mannan), malé části glykolipidů a komplexní směsi polypeptidů. Rychle rostoucí mykobakterie jako jsou *M. phlei* a *M. smegmatis* mají v povrchové vrstvě hlavně složité směsi proteinů. (Pereira, 2020)

V případě některých klinicky významných mykobakterií je možné pozorovat na základě rozdílů složení buněčné stěny jejich rozdílný růst a vzhled kolonií. U *M. abscessus* je možné pozorovat na některém typu kolonií nízký a hrubý vzhled, u

kterého je v buněčné stěně menší množství glykopeptidolipidů. Oproti tomu v případě většího množství glykopeptidolipidů je vzhled kolonií vysoký, hladký a spojený s tvorbou biofilmu. Podobný případ je pozorovatelný i u *M. avium*. (Van Ingen, 2012)

Díky těmto lipidovým komponentám jsou mykobakterie hydrofobní a dobře chráněné proti vnějším vlivům jako je vyschnutí nebo působení detergentů. Obdobnou stavbu buněčné stěny mají i nokardie a některé korynebakterie. Mykolové kyseliny jsou nejspíše zodpovědné za acidorezistenci mykobakterií, která je pro ně charakteristická. (Bednář, 1996; Julák, 2015; Greenwood, 1999)

5.4 Členění mykobakterií

V rodu *Mycobacterium* rozeznáváme čtyři skupiny mykobakterií, které se řadí mezi lidské patogeny. Patří sem *Mycobacterium tuberculosis* komplex, do kterého jsou řazeny *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae* a *M. mungi*. Do druhé skupiny patří samostatné *Mycobacterium leprae*, které způsobuje u nemocných malomocenství. Mezi poslední dvě skupiny se dělí další druhy mykobakterií řadící se mezi tzv. netuberkulózní mykobakterie (NTM). (Bednář, 1996; Forbes, 2016; Greenwood, 1999; Chapman, 1967; Julák, 2015)

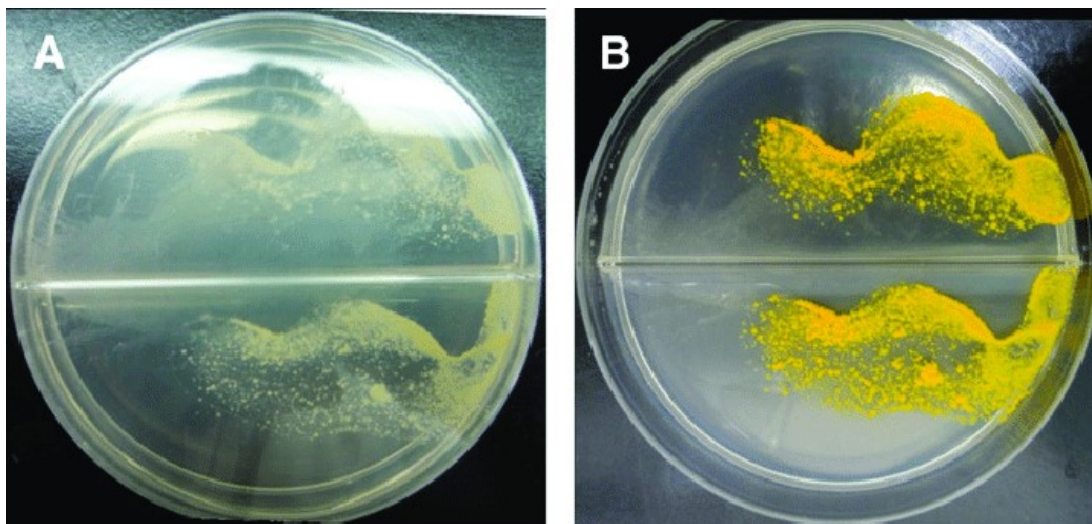
5.4.1 NTM charakteristika a třídění do skupin

Netuberkulózní mykobakterie jsou bakterie, které dělíme na pomalu rostoucí NTM a rychle rostoucí NTM. Klinicky významnými NTM jsou *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. marinum* a jiné. Mezi saprofytické netuberkulózní mykobakterie řadíme *M. gordonae*, *M. flavescens*, *M. terrae* komplex, *M. smegmatis*, *M. phlei*. (Bednář, 1996; Forbes, 2016; Greenwood, 1999; Chapman, 1967; Julák, 2015)

Další způsob, kterým je možné netuberkulózní mykobakterie rozlišit, je pomocí dělení do několika kategorií, které popsal v roce 1959 Ernest Runyon. Tento mikrobiolog, specializující se na mykobakterie, rozdělil NTM na základě rychlosti jejich růstu a pigmentace. Při využití této klasifikace netuberkulózních mykobakterií rozlišujeme čtyři skupiny. (Greenwood, 1999; Chapman, 1967; Julák, 2015; Kate Kimball – Archives West, 2020)

První skupinou jsou fotochromogenní NTM, které se ve tmě jeví jako nepigmentované, ovšem po osvětlení pigment tvoří (nejčastěji žlutý). Do této skupiny

řadíme *Mycobacterium kansasii*, *M. simiae*, *M. marinum* (viz obr. 2), *M. kansasii* a *M. simiae* jsou původci plicních onemocnění. Narozdíl od nich, *M. marinum* je původce především kožních onemocnění jako například plovárenského granulomu. (Greenwood, 1999; Chapman, 1967; Julák, 2015)



Obrázek 2 - Kultivace *M. marinum* na agarových půdách Middlebrook 7H11 vykazující fotochromogenní charakteristiku.

A) Kultivace ve tmě a růst bílých či světle zbarvených kolonií

B) Po vystavení světlu zbarvení do zářivě žluté

(zdroj: Ho, 2011)

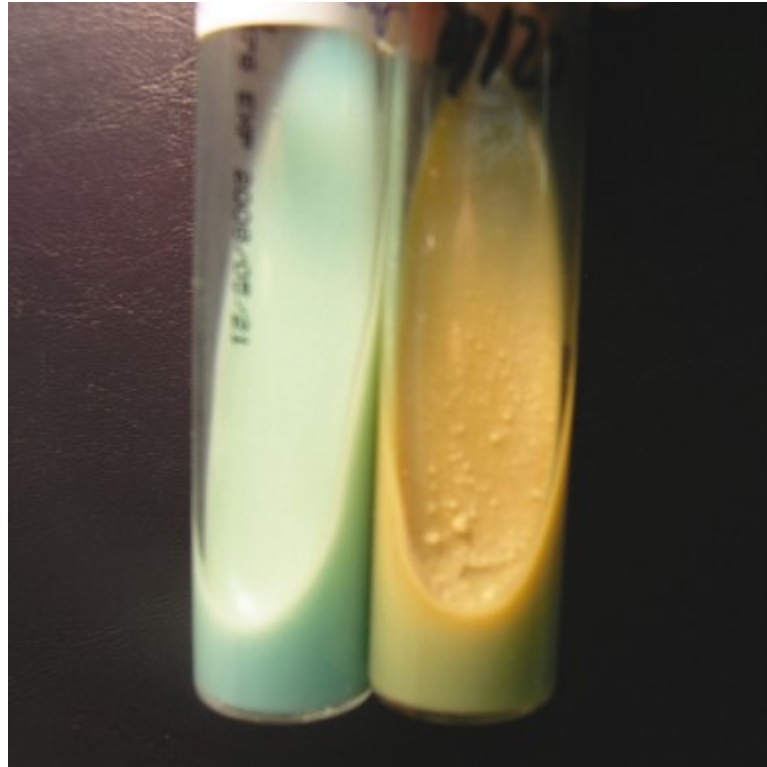
Druhou skupinu tvoří skotochromogenní mykobakterie, které mají žlutý až oranžový pigment na světle i ve tmě. Většina pomalu rostoucích skotochromogenních mykobakterií, které jsou izolované z moči a sputa, nemá klinický význam. Do této skupiny řadíme *M. gordonae* (dříve *M. aquae*), které se často objevuje ve vodě, a zároveň často kontaminuje klinický materiál. Nebývá zdrojem plicních onemocnění. Kultivace *M. gordonae* na Löwenstein-Jensenově a na Ogawavově půdě je na obrázku č. 3. Další mykobakterie, které patří do druhé skupiny, jsou *M. scrofulaceum* a *M. szulgai*. *M. scrofulaceum* vyvolává u lidí skrofulózu neboli krtici, cervikální lymfadenitidu, ale také plicní onemocnění. *M. szulgai* není typickým zdrojem plicních onemocnění a burzitid. Zvláštní vlastností této bakterie je, že během inkubace při 37 °C se chová jako skotochromogenní mykobakterie. Během inkubace při 25 °C se ale chová jako bakterie fotochromogenní. (Greenwood, 1999; Chapman, 1967; Julák, 2015)



**Obrázek 3 - Kultivace *M. gordonae* na Löwenstein-Jensenově půdě (A, B) a na Ogawavově půdě (C)
 (zdroj: Microbiology pictures)**

Třetí skupinou jsou mykobakterie nefotochromogenní, které jsou charakteristické tím, že jejich kolonie postrádají pigmentaci. Důležitým oportunním patogenem je *Mycobacterium avium* komplex. Dále *M. ulcerans*, které způsobuje burulský vřed. Narozdíl od jiných mykobakterií produkuje toxin, který způsobuje následnou nekrózu kůže, a je součástí patogeneze onemocnění. *M. xenopi*, původně izolované z drápatky vodní, je termofilní mykobakterie a inkubuje se při 45 °C. *M. malmoense*, jehož výskyt se v posledních letech zvýšil, hlavně v oblasti severní Evropy, je častým původcem pulmonálních onemocnění. Pacienti, u kterých se prokáže nákaza touto bakterií, mívají sníženou funkci imunity a většinou se léčí s dalším onemocněním. Vzácným původcem onemocnění způsobené NTM, patřící do této skupiny, je *M. terrae* komplex. Do tohoto komplexu řadíme *M. terrae*, *M. triviale*, *M. nonchromogenicum*, *M. hiberniae*, *M. kumamotonense*, *M. arupense*, *M. senuense*, *M. paraterrae*, *M. sp. JDM601*, *M. engbaekii*, *M. longobardum* a *M. heraklionense*. (*M. sp. JDM601* je prozatím nepojmenovaný typ mykobakterie, u kterého se uvádí jen číselné označení.) V případě *M. terrae* může dojít k infekci při zahradničení nebo při práci na farmě. Další dva známé

druhy, které spadají do III. skupiny dle Runyona, je *Mycobacterium haemophilum*, které pro svůj metabolismus potřebuje hem nebo jiný zdroj železa (viz obr. 4), a *Mycobacterium genevense*, velmi pomalu rostoucí mykobakterie občasně izolovaná u pacientů nakažených HIV nebo trpících jiným imunokompromitujícím onemocněním. (Abgueguen, 2010; Greenwood, 1999; Chapman, 1967; Julák, 2015; Ngeow, 2015)



Obrázek 4 - Růst *M. haemophilum* na Löwenstein – Jensenově půdě. Vlevo bez růstu, vpravo růst mykobakterie na půdě s přidavkem citrátu železito – amonného. (zdroj: Kelley, 2011)

Poslední skupina zahrnuje tzv. rychle rostoucí mykobakterie, kam spadají čtyři nechromogenní druhy, které jsou patogeny u lidí. Jsou to *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* a *M. abscessus*. Tyto mykobakterie jsou většinou zodpovědné za infekce v ráně a abscesy vznikající po injekcích. Příležitostně mohou za onemocnění plic nebo diseminovanou formu onemocnění. Ostatní rychle rostoucí mykobakterie jsou pigmentované a ve většině případů nezpůsobují u lidí onemocnění. Mohou být ale kontaminací klinických vzorků, jelikož se nacházejí na genitáliích, a tím se dostávají do vzorků moči. V těchto vzorcích se občas může objevit *M. smegmatis* anebo *M. flavescens*. (Greenwood, 1999; Chapman, 1967)

5.5 Epidemiologie NTM

5.5.1 Ve světě

S celosvětově rostoucím počtem imunosuprimovaných pacientů narůstá i incidence netuberkulózních mykobakteriálních onemocnění. Narozdíl od tuberkulózy, onemocnění způsobená NTM nepodléhají v některých zemích povinnému hlášení. Onemocnění plic, které je způsobeno NTM, podléhá hlášení například v Queenslandu v Austrálii nebo v některých státech v USA. Naopak v Oregonu je povinné hlásit jen mimoplicní výskyt NTM. (Prevots, 2017)

K popisu výskytu nemocí, jejich distribuci a úmrtnosti se využívají centralizované laboratoře, které se vyskytují v některých zemích v Evropě. Ačkoliv nejsou podrobné informace a studie k dispozici, využívá se záznamů získaných z referenčních laboratoří. Při pozitivním průkazu výskytu NTM se uvádějí všechny pozitivní izoláty spolu s věkem pacienta, pohlavím, zdrojem vzorku a druhem izolované NTM. (Prevots, 2017)

V roce 2008 proběhla globální spolupráce laboratoří mezi jednotlivými státy. Globální partneři v rámci skupiny NTM – Network European Trials Group poskytli výsledky identifikace druhů pro všechny pacienty, od nichž byla NTM izolována z plicních vzorků. Výsledky identifikace druhů byly získány od dvaceti tisíc sto osmdesáti pacientů z šedesáti dvou laboratoří ve třiceti zemích, kteří zastupovali národní nebo sub národní referenční laboratoře. Na základě těchto údajů vykazovaly převládající druhy výrazné rozdíly napříč kontinenty. (Prevots, 2017)

Nejčastějším onemocněním způsobeným NTM jsou plicní infekce. Jejich incidence se celosvětově v posledních letech zvýšila. Dle údajů publikovaných Hoefslootem a kol. v roce 2013, je *Mycobacterium avium* komplex nejběžnější NTM nalezenou ve vzorcích dýchacích cest. Dalšími mykobakteriemi, které jsou často izolovány z dýchacích cest, jsou *M. gordonae* a *M. xenopi*. Tyto údaje byly shromážděny z třiceti zemí na šesti kontinentech. Nejvyšší relativní výskyt MAC byl v Austrálii (71,1 %), poté v Asii (53,8 %), Severní Americe (52,0 %), Jižní Africe (50,5 %), Evropě (36,9 %) a Jižní Americe (31,3 %). Výskyt *M. gordonae* je v Evropě nejrozšířenější v Německu, zatímco výskyt *M. xenopi* v Maďarsku. V Asii, zejména na Tchaj-wanu, Jižní Koreji, Saudské Arábii, Indii, Singapuru a Malajsii, jsou hlavními druhy rychle

rostoucí mykobakterie a to hlavně *M. fortuitum* a *M. abscessus*. (Chin, 2020; Hoefsloot 2013)

Ve Velké Británii je pět referenčních laboratoří specializujících se na mykobakteriologii pro oblast Anglie, Walesu a Severního Irska. Jednotlivé případy výskytu v Anglii zpracovává analýza dat mezi roky 2007–2012. Ta odhalila zvyšující se výskyt *Mycobacterium avium* komplex u onemocnění plic. Většina pacientů, u kterých byl výskyt MAC popsán, byla starší šedesáti let. Kromě *M. avium* komplex (35,6 %) byly v plicních vzorcích izolovány *M. gordonae* (16,7 %), *M. chelonae* (9,6 %), *M. fortuitum* (8,2 %), *M. kansasii* (5,9 %), *M. xenopi* (5,9 %), a *M. abscessus* (5,0 %). Naopak u extrapulmonárních onemocnění byl pozorován trend sestupný. (Shah, 2016)

Ve Španělsku stejně jako v dalších zemích není zavedené povinné hlášení plicních infekcí způsobených netuberkulózními mykobakteriemi. Pro stanovení trendu výskytu byla analyzována data od ledna 1994 do prosince 2014 z oblasti Katalánska. V průběhu těchto jednadvaceti let byla analyzována data ze čtyř různých nemocnic a celkem bylo určeno šest set osmdesát případů výskytu. Prevalence se v průběhu let zvyšovala s tím, že více nakažených bylo mužů staršího věku. Výskyt v průběhu let se postupně zvyšoval u *M. avium* o 13 % u plicní nemoci a o 10 % u celkového výskytu nemoci. U *M. abscessus* se výskyt nemoci zvyšoval každý rok o 24 % u plicních onemocnění, o 22 % u celkového výskytu nemoci. V průběhu let naopak klesl výskyt *M. kansasii*, což byl hlavní zdroj plicních onemocnění mykobakteriemi ve zkoumaném období. (Santin, 2018)

Dle dat získaných z Národní referenční laboratoře mezi lety 2010 až 2015 se výskyt NTM na Slovensku zvýšil. Mezi nejčastěji izolované mykobakterie patří *Mycobacterium gordonae*, které se řadí do druhé skupiny dle Runyona. Kolonie jsou hladké a žlutě pigmentované. Bývá často kontaminantou pitné vody. Počet onemocnění způsobených touto mykobakterií se mezi lety 2010-2015 zvýšil z dvaceti pěti případů na čtyřicet osm. Nejvíce hlášených případů bylo v roce 2014. V tomto roce byla na základě rentgenových snímků plic potvrzena mykobakterií pouze u šesti pacientů. Tři nejtěžší případy byly zaznamenány po nákaze *M. abscessus*. Jeden z nakažených zemřel a u dvou byla i po přeléčení antibiotiky (ATB) pozitivní kultivace. Podobné terapeutické výsledky byly pozorovány u pacientů nakažených *M. avium* komplex. U těchto pacientů byl růst bakterií na kultivačních půdách poměrně snížen. Po určité době došlo k reinfekci. (Provazník, 2016)

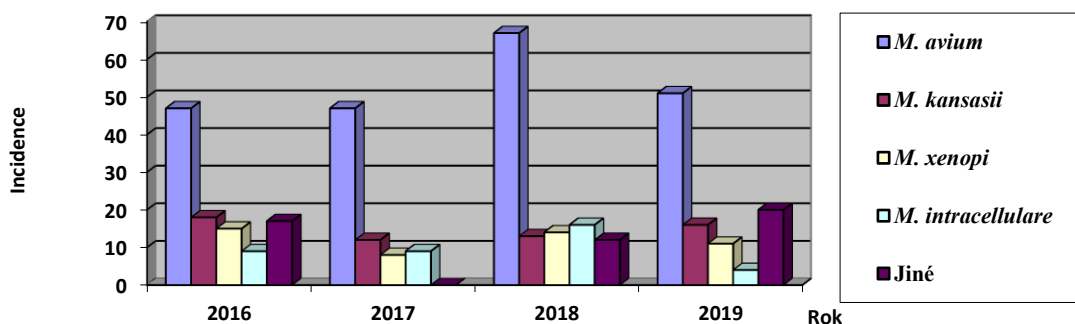
V Severní Karolíně v USA byla provedena analýza dat výskytu NTM mezi lety 2006–2010 v okresech Wake, Durham a Orange. Zpracované údaje pochází z nemocniční klinické laboratoře, Státní laboratoře veřejného zdraví Severní Karolíny a soukromé klinické laboratoře. V případě výskytu mykobakterií v plicích mluvíme o sedm set padesáti případech, kdežto extrapulmonárních případů bylo sto devadesát pět. Hlavním zdrojem nákazy u plicních nemocí byl MAC (50,9 %), *M. gordonae* (20,4 %) a *Mycobacterium abscessus* komplex (13,6 %). U mimoplicního onemocnění se převážně jednalo o nákazu MAC (40,7 %), *M. abscessus* komplex (28,0 %), a *Mycobacterium fortuitum* (10,4 %). (Smith, 2016)

V porovnání s tím se situace a problematika tuberkulózy pečlivě monitoruje. Od roku 1997 WHO každoročně zveřejňuje globální zprávu, ve které komplexně a aktuálně hodnotí epidemii TBC. Cílem zprávy je také zhodnocení pokroku v reakci na úrovni globální, regionální a celostátní. V rámci tuberkulózy a plánu jejího vymýcení byl v roce 2014 vytvořen plán, pomocí kterého se všechny členské země WHO a OSN zavázaly k postupům, kterými mělo dojít k ukončení epidemie TBC ve světě. Cílem je snížit náklady na léčbu ze strany pacientů, úmrtí a incidenci TBC do roku 2030 v porovnání s rokem 2015.

Milníkem pro snížení incidence jsou roky 2020, kdy mělo ideálně dojít k 20% snížení výskytu, a rok 2025, kdy by v ideálním případě mělo dojít ke snížení o 50 %. Cílem je v roce 2030 dosáhnout snížení incidence tuberkulózy o 80 % (nových a relapsových případů na 100 000 obyvatel za rok). V případě úmrtí na TBC je předpoklad, že by mělo dojít k 90% snížení ročního počtu úmrtí. Milníky jsou opět rok 2020, kde se počítalo se snížením o 35 %, a rok 2025, kdy by mělo dojít ke snížení o 75 %. Globálně kumulativní snížení incidence mezi lety 2015–2019 bylo 9 % (ze sto čtyřicet dvou nových případů na sto třicet nových případů na 100 000 obyvatel), včetně snížení o 2,3 % v letech 2018 a 2019. Celkem sedmdesát osm zemí včetně například Kambodži, Keni, Namibie, Ruské federace dosáhli milníku v roce 2020, případně k němu mají velmi blízko. Úmrtí na TBC se povedlo mezi lety 2015–2019 kumulativně snížit o 14 %, což není ani polovina stanoveného cíle. Ovšem v Evropě k roku 2019 došlo ke snížení o 31 % a v afrických státech došlo ke snížení o 19 %. Milníku už dosáhli Bangladěš, Keňa, Mozambik, Myanmar, Ruská federace, Sierra Leone a Sjednocená republika Tanzanie. Velmi blízko k dosažení milníku 35 % má i Vietnam. (WHO, 2020)

5.5.2 V České republice

V České republice podléhá tuberkulóza a ostatní mykobakteriízy povinnému hlášení a zavádění dat do Národního registru. Mezi lety 2006 až 2017 incidence „mykobakterií jiných než TBC etiologie“ nepravidelně kolísá kolem hodnoty 1/100 000 obyvatel (rozptyl 0,80 – 1,3). V roce 2016 bylo hlášeno osmdesát tři plicních mykobakterií a dvacet tři mykobakterií s jinou lokalizací, incidence 1/100 000 obyvatel (čtyřicet sedm případů způsobených *Mycobacterium avium*, osmnáct případů *Mycobacterium kansasii*, patnáct případů *Mycobacterium xenopi*, devět případů *Mycobacterium intracellulare* a sedmnáct případů způsobených dalšími mykobakteriemi). Oproti tomu v roce 2017 bylo hlášeno celkem osmdesát devět, z čehož bylo sedmdesát jedna plicních a osmnáct s jinou lokalizací, incidence 0,84/100 000 obyvatel (čtyřicet sedm případů způsobených *Mycobacterium avium*, dvanáct případů *Mycobacterium kansasii*, osm případů *Mycobacterium xenopi*, a devět případů *Mycobacterium intracellulare*). V roce 2018 bylo nahlášeno celkem sto dvacet osm případů – osmdesát osm plicních a čtyřicet s jinou lokalizací, incidence 1,21/100 000 obyvatel (šedesát sedm případů *Mycobacterium avium*, pět případů *Mycobacterium avium – intracellulare*, třináct případů *Mycobacterium kansasii*, čtrnáct případů *Mycobacterium xenopi* a šestnáct případů *Mycobacterium intracellulare* a sedmnáct případů způsobených jinými mykobakteriemi). Nejčastěji byl hlášený výskyt NTM v Moravskoslezském a Ústeckém kraji. V roce 2019 bylo hlášených celkem sto tři případů – šedesát sedm plicních a třicet šest mimoplicních, incidence 0,97/100 000 obyvatel (padesát jedna případů *Mycobacterium avium*, jeden případ *M. avium – intracellulare*, šestnáct případů *Mycobacterium kansasii*, jedenáct případů *Mycobacterium xenopi*, čtyři případy *Mycobacterium intracellulare*, a dvacet případů způsobených jinými mykobakteriemi). Největší výskyt NTM v ČR v roce 2019 byl stejně jako o rok dříve v Moravskoslezském kraji. (Losse, 2019; ÚZIS, 2018; ÚZIS, 2019)



Graf 1 - Incidence výskytu NTM na území ČR v letech 2016 - 2019.
(zdroj: Losse, 2019; ÚZIS, 2018; ÚZIS, 2019)

Informace o výskytu tuberkulózy jsou od roku 2016 každý rok shrnuty v publikaci „Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice“, kterou vydává Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (ÚZIS ČR). Tato publikace nepřímo navazuje na publikaci „Tuberkulóza a respirační onemocnění“, vydávané od roku 1960 do roku 2014. „Tuberkulóza a respirační onemocnění“ tvořily výběr nejdůležitějších přehledových tabulek charakterizující výskyt hlášených případů TBC a jiných mykobakterií v ČR. (ÚZIS, 2019)

Výskyt tuberkulózy na území ČR mezi lety 2006-2017 poklesl z devíti set padesáti tří případů na pět set pět (tedy z incidence 9,5 na 4,8/100 000 obyvatel). V roce 2018 bylo nahlášeno čtyři sta čtyřicet čtyři onemocnění TBC všech forem a lokalizací (4,2/100 000 obyvatel). Oproti tomu v roce 2019 bylo hlášeno čtyři sta šedesát čtyři případů tuberkulózy (4,3 případů na 100 000 obyvatel). Jak je patrné z dat sesbíraných v průběhu posledních let, výskyt TBC má stále klesající trend. V rámci dat sesbíraných celosvětově patří ČR k zemím s nízkým výskytem tuberkulózy. (ÚZIS, 2019; ÚZIS,2018)

5.6 Klinický význam mykobakterií

Oproti *Mycobacterium tuberculosis*, které se jako intracelulární parazit nalézá hlavně v makrofázích nakaženého, a *Mycobacterium leprae*, které se může vyskytovat taktéž v buňkách hostitele a případně se jeho deoxyribonukleová kyselina (DNA) může vyskytovat v půdě v okolí nakažených lidí, netuberkulózní mykobakterie můžeme nalézt všude v životním prostředí. Jsou k nalezení zejména v přírodních sladkých a slaných vodách, biofilmech, aerosolech a v rozpadající se vegetaci, často na rozmezí pevnina/voda. (Tió-Coma, 2019; Petrini, 2006)

NTM mají schopnost adaptace na prostředí, ve kterém se vyskytují, a proto mají potenciál způsobit klinické onemocnění u predisponovaných hostitelů a ovlivnit různé cílové orgány a tkáně. Infekce se přenáší vdechováním aerosolu nebo přímým kontaktem s inokulem, nejčastěji však z člověka na člověka. Některé získané či vrozené zdravotní stavy mohou být predispozicí a usnadnit nákazu NTM. Mezi tyto stavy patří vrozený či získaný nedostatek T-buněk nebo makrofágů, cystická fibróza, bronchiektázie a HIV. Predispozicí může být také úraz nebo lékařský zákrok. Často bývají infekce způsobené NTM spojené s úrazy, při kterých se do rány dostane cizí materiál jako je písek nebo

dřevěné třísky. Při chirurgických zákrocích může dojít k infekci při použití nesterilní jehly nebo při zavedení kosmetických či lékařských implantátů do tkáně. Průběh a vývoj onemocnění závisí na vlastnostech, druhu, přítomnosti případného predispozičního faktoru a prostředí. (Petrini, 2006)

5.6.1 Lymfadenitidy

Lymfadenitidy jsou jeden z nejčastějších způsobů projevu nákazy NTM u dětí mladších 5 let. Vyšší výskyt nemoci u dětí je v zemích, kde je incidence tuberkulózy nižší. I přesto se jedná o vzácnou nemoc. Oproti tomu výskyt lymfadenitidy ve všech věkových skupinách je vyšší v zemích s vysokým výskytem tuberkulózy způsobené *M. tuberculosis*. U dětí, které byly očkovány vakcínou BCG (bacillus Calmette-Guérin) ihned po narození, byl výskyt nemoci velmi vzácný. Ovšem vzhledem k tomu, že v posledních letech některé země ukončili povinné očkování proti tuberkulóze, došlo v předchozích desetiletích k nárůstu počtu nemocných. (Greenwood, 1999; Garcia-Marcoz, 2017; Olivas-Mazón, 2021)

Mykobakterie způsobující lymfadenitidu se liší v závislosti na různých místech výskytu. *Mycobacterium avium* komplex je nejčastější původce onemocnění ve světě. Dříve byla chybně určena jako patogen způsobující onemocnění mykobakterie *M. scrofulaceum*. Jednalo se ale nejspíš o špatně identifikované mykobakterie z MAC. (Greenwood, 1999)

Kontakt s ptáky byl popsán jako rizikový faktor pro NTM lymfadenitidu, ale spojitost s onemocněním nebyla prokázána. Druhy, které infikují ptáky, se mohou lišit od těch, které infikují lidi. Například *M. avium hominissuis* je původcem nemoci u lidí a prasat oproti tomu *M. avium avium* je původce nemoci u ptactva. Tento rozdíl by mohl znamenat, že jen některé poddruhy, přibližně 40 %, se podílejí na etiologii onemocnění u lidí, a proto se kontakt s ptactvem nezařadil mezi rizikové faktory pro infekci MAC. (Garcia-Marcoz, 2017)

V některých zemích jako je Španělsko, Itálie, Finsko, Jižní Korea, Austrálie, Saudská Arábie a Velká Británie je jednou z mykobakterií způsobující lymfadenopatii *Mycobacterium lentiflavum*. Obvykle se jí daří v podzemních vodách. Rizikovým faktorem, který z toho vyplývá, je plavání v uzavřených vodních plochách nebo pití kohoutkové vody. (Garcia-Marcoz, 2017)

Uzliny, které bývají onemocněním zasažené, jsou osamělé submandibulární nebo cervikální lymfatické uzliny. Zřídka mohou být zasaženy i jiné skupiny lymfatických uzlin jako jsou podpažní uzliny nebo uzliny v tříselné oblasti u pacientů s těžkou poruchou imunity. Zvětšení uzlin většinou začíná jako bezbolestný otok, později se otok stává fluktuujícím a uvnitř se hromadí hnis (viz obrázek 5). Později může dojít k prasknutí, výtoku hnisu a vzniku sinu. Příznaky jako je horečka, úbytek hmotnosti a únava nemusí být přítomné. (Sharma, 2020; Greenwood,1999)



Obrázek 5 - Klinický projev NTM cervikofaciální lymfadenitidy. (Willemse, 2018)

Vzhledem k malému množství bakterií, přítomných v těle nemocného, může být obtížné stanovit diagnózu správně. Proto se na místo kultivace a mikroskopie používají molekulární testy jako je například PCR. Pakliže nehrozí riziko narušení nervových zakončení, provede se excize lymfatické uzliny. K vyjmutí uzliny dochází především z diagnostických důvodů. (Greenwood, 1999)

5.6.2 Kožní léze

Rozlišují se tři hlavní typy onemocnění kůže. Prvním typem je vřed Buruli, druhým postinjekční a posttraumatické abscesy a třetím pak plovárenský granulom. (Greenwood, 1999)

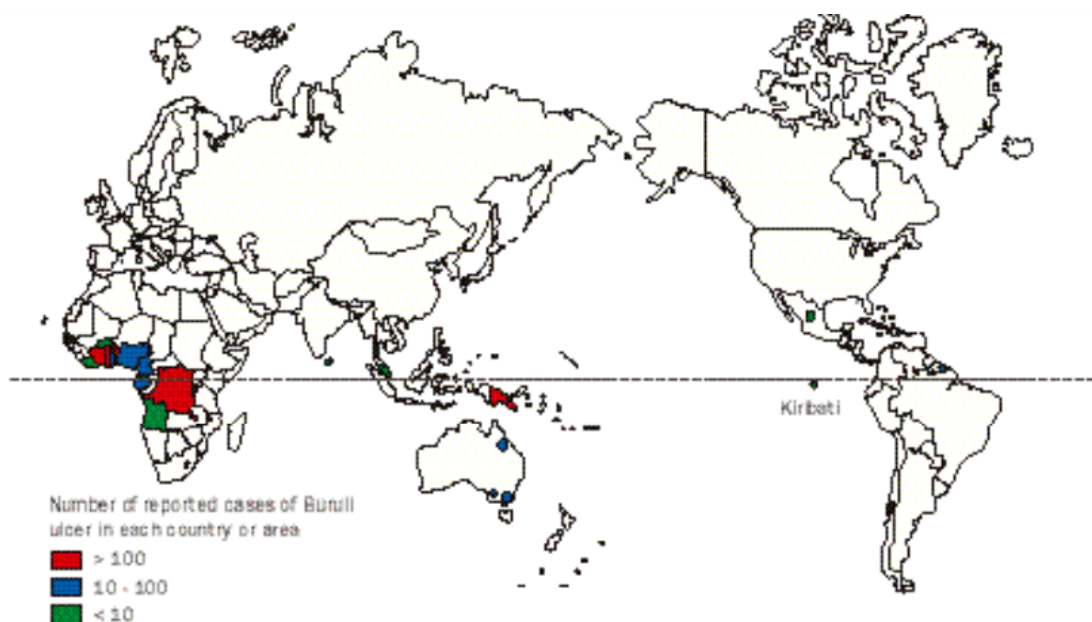
5.6.2.1 Vřed Buruli

Nejčastějším původcem kožních lézí je *M. ulcerans*. Jedná se o třetí nejčastější onemocnění lidí s imunodeficiencí způsobené mykobakteriemi hned po tuberkulóze a

lepře. Tato mykobakterie vyvolává onemocnění vřed Buruli známý také jako searlský vřed, daintreeský vřed anebo bairnsdaleský vřed. (van der Werf, 1999)

Vřed Buruli byl poprvé popsán v roce 1948 MacCallumem a jeho kolegy u šesti australských pacientů. Tito pacienti měli buď na ruce nebo na noze ulcerující lézi. Jeden z pacientů, dvouletý chlapec, měl pozitivní tuberkulinový test, ale byl bez jakýchkoliv příznaků tuberkulózy. V histologických preparátech byly nalezeny acidorezistentní bakterie, které potvrdily přítomnost *Mycobacterium sp.* Těmito mykobakteriemi se poté naočkovala zvířata a u těch se stejně jako u pacientů projevíly ulcerace. Při pozorování nakažených potkanů se zjistil nejvýraznější výskyt ulcerací na šourku, končetinách a ocasu zvířat. Izolace mykobakterie byla zpočátku neúspěšná, při pokusech o kultivaci za nižších teplot se dostavil úspěch, a to hned ve třech pokusech. MacCallumen spolu se svým týmem pojmenovali tuto bakterii Bairnsdalenský bacil podle místa, kde šest nakažených žilo. Později byla přejmenována na *Mycobacterium ulcerans*. (van der Werf, 1999; Wolinsky, 1979)

V průběhu dalších let byly hlášeny další případy, a to hlavně v oblasti Konga (k roku 1974 hlášeno čtyři sta třicet pacientů), Ugandy, Nigerie, Ghany, Libérie, Gabonu, Toga a dalších. Další výskyt byl hlášen v Austrálii, Papua Nové Guiney, některých zemích Latinské Ameriky a na Srí Lance. (van der Werf, 1999)



Obrázek 6 - Mapa celosvětového výskytu vředu Buruli. (van der Werf, 1999)

V současné době je dle dat WHO potvrzený výskyt ve třiceti třech zemích, z čehož čtrnáct zemí pravidelně hlásí případy výskytu vředů. Roční počet podezření na vřed Buruli v celosvětovém měřítku činil přibližně pět tisíc případů ročně až do roku

2010. Poté se začalo číslo postupně snižovat do roku 2016, kdy byl počet nemocných lidí devatenáct set šedesát jedna. Od té doby dochází opět k rostoucímu trendu výskytu nemoci (viz tabulka 2). V roce 2020 se předpokládá zkreslení počtu nemocných kvůli výskytu onemocnění COVID – 19. (WHO, 2021)

Tabulka 2 - Výskyt předpokládaných onemocnění vředu Buruli mezi lety 2016–2020.

Rok	Počet případů
2016	1961
2017	2349
2018	2713
2019	2271
2020	1258

Většina infekcí způsobných *M. ulcerans* je pravděpodobně získaných z přírodního prostředí. Předpokladem je, že se přes malé oděrky a drobné rány dostává mykobakterie k podkožnímu tuku. Pacienti v době, kdy se projeví ulcerace, již zapomenou, že nějakou ranku měli, nebo si toho povětšinou ani nevšimnou. Ve většině případů, kdy je hlášeno větší množství nemocných, je vyšší výskyt nemoci u dětí v porovnání s dospělými. Přesný způsob nákazy a přenosu nemoci je doposud neznámý. (van der Werf, 1999)

Prvním projevem nemoci je tvrdý pevný uzlík, který může svědit. Preulcerózní léze zahrnují také plak, který je definován jako větší oblast ztvrdlé kůže a otoky. V druhé fázi se uzlík zvětšuje a dochází k centrálnímu změknutí a propadnutí kvůli probíhající nekróze subkutánní tukové tkáně. Kůže nad vznikajícím vředem se stává anoxickou a hroutí se, nekrotická tkáň pod kůží vyteče a dochází k vzniku jednoho či více vředů s podkopanými okraji. V této fázi se v lézi nachází velké množství mykobakterií, na které tělo nereaguje, a buněčná imunita zůstává v nečinnosti. Kvůli neschopnosti těla bránit se probíhající infekci dochází k rozrůstání vředů, které se mohou rozrůst přes celou končetinu nebo trup. Jednotlivé fáze onemocnění jsou patrné na obrázku č. 7. (Greenwood, 1999; van der Werf, 1999)

Onemocnění bylo rozděleno na základě závažnosti do tří kategorií. První kategorií jsou jednoduché a malé léze (32 % případů). Druhou kategorií jsou ulcerózní a neulcerózní plaky a edematózní formy (35 % případů). Třetí nejzávažnější kategorií jsou

diseminované smíšené formy jako je osteitida, osteomyelitida a stavy při kterých dojde k proniknutí infekce do kloubu (33 % případů). (WHO, 2021)



Obrázek 7 - Klinické formy vředu Buruli A) tvrdý uzlík, B) plak, C) edém, D) vřed (zdroj: Wadagni, 2015).

Z neznámých důvodů může nakonec dojít k tomu, že tělo rozpozná patogen, a dojde k reaktivaci imunitní odpovědi a acidorezistentní bakterie z rány vymizí. Tělo začne odpovídat na antigeny *M. ulcerans* a může dojít k vyléčení. Vyléčení pacienti poté mívají značná znetvoření a postižení, které jsou způsobené jizvami a kontrakturami. (Greenwood, 1999)

Velkou roli v patogenezi a nekróze hrají toxiny, které *M. ulcerans* produkuje. Hlavními toxiny, které mykobakterie produkuje, jsou mykolaktony. Jedná se o toxiny na bázi lipidů, které patří do skupiny makrolidů odvozených od polyketidů. Kmeny izolované v Africe produkují škodlivější toxiny než ty z Austrálie. Při pokusech *in vitro* byla prokázána schopnost toxinů v buněčných kulturách zastavit buněčný cyklus v G1 fázi. (van der Werf, 1999; Greenwood, 1999; Heifets, 2004)

Léčba spočívá v kombinaci antibiotik a doplňkové léčby. Doporučená kombinace ATB je kombinace rifampicinu (RIF) (10 mg/kg jednou denně) a klaritromycinu (7,5 mg/kg dvakrát denně). Dalším léčebný postup spočívá

v operativním odstranění prvotních uzlíků a v případě pozdějšího stádia onemocnění v odstranění nekrotické tkáně. Je zapotřebí odstranit veškerou nekrotickou tkáň, aby nedošlo následně k opětovné infekci případně k prostoupení mykobakterií do hlubších částí kůže. U pacientů, kteří mají již horší stádia nemoci s rozvinutými kontrakturami a ankylózami zasahujícími až do kloubů, může být zapotřebí fyzioterapie nebo plastická chirurgie. (WHO, 2021; van der Werf, 1999)

V současné době neexistují žádná preventivní opatření proti nákaze *M. ulcerans*. Zdá se, že očkování proti tuberkulóze oslabeným kmenem *Mycobacterium bovis* (BCG – bacillus Calmette-Guérin) poskytuje omezenou ochranu před nákazou. Důležitou roli hraje hlavně včasná detekce nákazy a započetí léčby vhodnými ATB. (WHO, 2021)

5.6.2.2 Po injekční a po traumatické abscesy

Abscesy způsobené po podání injekce nebo po operaci bývají způsobeny většinou rychle rostoucími mykobakteriemi, mezi které patří *M. abscessus*, *M. fortuitum* a *M. chelonae*. Mezi méně časté původce patří *M. peregrinum* a *M. flavescens*. (Greenwood, 1999)

K rozvoji abscesů po injekci dochází sporadicky hlavně v případě, kdy mykobakterie kontaminuje materiál použitý v aplikované injekci. K propuknutí onemocnění může dojít v průběhu týdne, roku i víc od injekce. Abscesy jsou vysoce bolestivé, mohou být velké 8–10 cm a léčba může trvat i několik měsíců. Hlavním způsobem léčby je drenáž nebo případně excize. Léčba léky není doporučována, pokud se nejedná o větší výskyt abscesů nebo lokální šíření nemoci, jako tomu může být u pacientů s diabetem, kteří si aplikují inzulín. (Greenwood, 1999)

Příkladem je případ mladé diabetičky z Anglie z roku 1979. Po injekcích inzulínu se jí objevily na stehnech, kde si dávala inzulín, léze velikosti 2 x 3 cm. Za pár týdnů se léze rozpadly a došlo k uvolnění hnisu. V diabetologickém centru, kam se žena obrátila o pomoc, nenašli při rutinní kultivaci žádného původce. Pozitivní kultura na mykobakterie byla získána až v únoru 1980. Tato pozitivní kultura byla vypěstována až po pěti neúspěšných pokusech o kultivaci čerstvého bioptického materiálu. Kultivací byl potvrzen výskyt *M. chelonae* var *chelonae*. Pacientka i přes původní rezistenci zareagovala na léčbu a uzdravila se. Po dalším šetření bylo zjištěno, že pacientka pravděpodobně špatně sterilizovala jehly pro opětovné dávkování inzulínu, což mělo za následek kolonizaci jehly a následnou tvorbu abscesu. (Jackson, 1981)

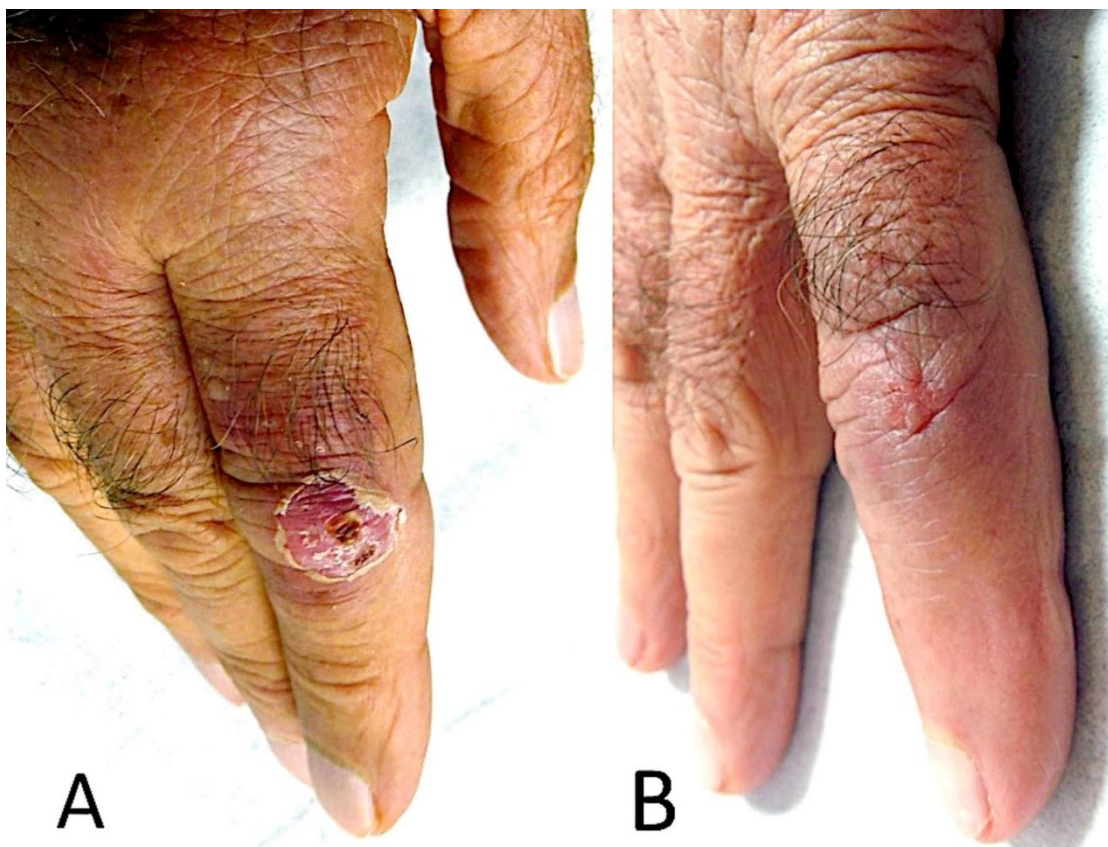
Dalším případem je pětadvadesátiletý muž, který byl v březnu roku 1967 na dovolené v Mexiku. V průběhu dovolené onemocněl enteritidou a byla mu na místní klinice podána injekce penicilinu. Po návratu domů navštívil muž kvůli zánětu močového měchýře urologa, který nasadil léčbu antibiotiky. Léčba byla úspěšná na urologické příznaky, ale horečka a neustálé nepohodlí nepřestávaly. Lékař následně objevil absces v místě, kam byla muži aplikována penicilinová injekce. Pomocí kultivace a biochemických testů byl potvrzen výskyt *M. fortuitum*. Při testu na citlivost na antibiotika bylo zjištěno, že zkoumaný kmen je rezistentní ke všem dvanácti standartním ATB. Léčba spočívala v drenáži a podání kanamycinu, na který jediný nebyla potvrzena rezistence. Léčba trvala celkem dva měsíce. (Clapper, 1967)

Větší nebezpečí představují léze spojené s operacemi. Hlavním rizikem jsou procedury zahrnující vložení protézy jako je srdeční chlopeč. Po úrazu oka může dojít k rozvoji zánětu rohovky. S infekcemi srdce je spojené *M. chimaera*, které se hojně vyskytuje v půdě, prachu a vodě. Patří mezi oportunní hrozbu při operaci srdce, která vyžaduje mimotělní oběh, anebo při koronárním bypassu. (Miskoff, 2018)

5.6.2.3 Plovárenský granulom

Původcem plovárenského granulomu je *M. marinum*. Toto atypické mykobakterium se vyskytuje v slané i sladké vodě, například akvária, pláže, bazén, řeky, jezera a staré studny. Primárně se jedná bakterii způsobující infekce ryb, obojživelníků, hadů, úhořů a ještěrek. Právě sladkovodní a mořské ryby bývají vektorem nemoci. Vyššímu riziku nákazy jsou vystaveni rybáři, lidé pracující s rybami, akvaristé a pacienti se sníženou imunitou. Poprvé bylo *M. marinum* izolováno již v roce 1926, ale teprve až o 25 let později byla prokázána infekčnost u lidí, a to u návštěvníků bazénu. (Gray, 1990; Greenwood, 1999; Vega-Lopéz, 2020)

Řadíme ho do první skupiny dle Runyona, roste po dobu 7-14 dnů při teplotě 32°C. Proto se při nákaze projevuje na akrálních částech těla, kde je teplota nižší. Infekce se projevuje přibližně po třech týdnech od expozice patogenu. Prvním příznakem jsou malé papuly na rukou, kolenech, loktech a nohách. Tyto papuly jsou bezbolestné, mohou svědit, tvoří se plak, který je obvykle osamělý a často ulceruje (viz obrázek 8). Někdy může dojít k výtoku hnisu. Léčba bývá zdlouhavá kvůli časté rezistenci na známá antituberkulotika. (Gray, 1990; Greenwood, 1999; Vega-Lopéz, 2020)



Obrázek 8 - Asymptomatický erytematózní, šupinatý uzlík nad proximálním interfalangeálním kloubem pravého ukazováčku způsobený *M. marinum*
A) Erytematózní, šupinatý uzlík nad pravým ukazováčkem
B) Téměř úplná regrese léze po dvouměsíční léčbě doxycyklinem.
 (zdroj: Assiri, 2019)

5.6.3 Plicní onemocnění

Nemoc způsobená netuberkulózními mykobakteriemi se v oblasti hrudníku a plic projevuje nejčastěji jednou ze tří forem. První forma projevu je podobná tuberkulóze. Klasicky postihuje horní laloky plic starších mužů s anamnézou kuřáka a chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN). Druhou formou je nodulární bronchiektázie u štíhlých starších žen nekuřáček, které mívají nějaké kosterní deformace a trápí je kašel. Poslední třetí formou je hypersenzitivní pneumonitida po použití vířivek a léčivých koupelí. (Glassroth, 2008; Sharma, 2020)

Mycobacterium avium komplex (*M. avium*, *M. intracellulare*) společně s *M. abscessus* a *M. kansasii* bývají nejčastějšími původci nákazy. Krom těchto nejčastěji izolovaných mykobakterií může být původcem onemocnění i jakákoliv další NTM jako např. *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. simiae* a další. (Glassroth, 2008; Heifets, 2004)

S rozvojem nemoci souvisí některá chronická onemocnění jako je CHOPN, cystická fibróza, gastroezofageální reflux, zvracení a poruchy hrudní stěny. Na základě těchto onemocnění dochází ke zvýšenému riziku možnosti nákazy NTM. *M. xenopi*, *M. kansasii* a *M. malmoense* mohou způsobit koinfekci při bronchiektázii a onemocnění plic způsobené aspergilem. Výskyt NTM byl větší u pacientů, kteří měli obě z výše uvedených nemocí než jen u pacientů, kteří měli jen bronchiektázii. Přítomnost plísňe typu *Aspergillus* nepříznivě ovlivňuje prognózu. (Glassroth, 2008; Chalmers, 2018)

Přenos nemoci z člověka na člověka není rozdílný od tuberkulózy typický. Stejně tak přenos ze zvířete na člověka nebyl popsán, ale zvířata jsou rezervoárem pro NTM. Sdílení vody mezi zvířaty a lidmi ovšem už může být zdrojem infekce. Přesný způsob nákazy není popsán, ale kvůli distribuci NTM v přírodě se předpokládá, že k nákaze je potřeba patogen požit, vdechnout nebo implantovat například škrábnutím. Při plicní nákaze způsobené NTM dochází nejspíš k vdechnutí aerosolu obsahujícího mykobakterie. Pravděpodobným nejčastějším zdrojem jsou sprechy v koupelně, kde vznikají tak malé kapičky aerosolu, aby byly schopné proniknout až do alveol. Takto malé částice mohou vzniknout i při zalévání půdy, při kterém vířící se prachové částice s mykobakteriemi pronikají do alveol. Důležitou roli hrají i nozokomiální infekce, ke kterým může dojít po kontaminaci vodního zdroje, zdravotnického vybavení anebo dialyzačních roztoků. (Johnson, 2014)

5.6.3.1 Plicní onemocnění způsobené *M. kansasii*

M. kansasii bylo poprvé izolováno v roce 1953. Hlavní charakteristikou kolonií je jejich změna barvy při kultivaci na světle ze světle žluté na oranžovou, na základě čehož se řadí do první skupiny dle Runyona. Mykobakterie byla primárně klasifikována jako patogen postihující plíce. Později bylo zjištěno, že může postihnout i jiné části těla jako je urogenitální trakt, lymfatické cesty nebo kůži. Oproti jiným NTM není *M. kansasii* izolována z půdy a přírodní vody, ale bývá často ve vodě kohoutkové. K nákaze většinou dochází aerosolovou cestou. Přenos nemoci z člověka na člověka není typický krom dvou případů v jedné rodině, kde byly stejné podmínky. Proto je předpoklad, že došlo k přenosu ze stejného zdroje ve stejný okamžik, nikoli k přenosu z člověka na člověka. (Johnston, 2017)

Přesná čísla, určující výskyt *M. kansasii*, je těžké určit, jelikož na rozdíl od tuberkulózy nespadá mezi hlášené nemoci. Určení incidence *M. kansasii* se mění podle

území a jednotlivých obdobích. V severní Americe je největší výskyt v centrální a severní oblasti. V Evropě je potom pravidelně nejvíce hlášených případů ve Španělsku, Anglii a České republice. Také Japonsko, Severní Afrika a Brazílie nahlásily vysoký výskyt nemoci. Místa zvýšené nákazy poukazují na možnost, že větší výskyt je v zemích s vyšší industrializací. Nebyly ovšem provedeny žádné studie na potvrzení nebo vyvrácení této domněnky. (Heifets, 2004; Johnston, 2017)

Příznaky způsobené *M. kansasii* jsou totožné s těmi, které způsobuje *M. tuberculosis*, kvůli tomu je obtížné od sebe rozpoznat původce nemoci. Většina pacientů má několik měsíců před diagnózou plicní příznaky. Nejběžnějšími příznaky jsou kašel, bolest na hrudi, dušnost a hemoptýza. Část případů (cca 20 %) je odhaleno náhodou na základě neuctivějšího kašle při rentgenu plic. Pacienti, u kterých bylo onemocnění prokázáno, jsou v širokém věkovém rozpětí. Největší prevalence nemocných je mezi padesátým až šedesátým rokem života a s převahou mezi muži. Etnické a socioekonomické rozdíly nebyly důsledně studovány. (Heifets, 2004); Johnston, 2017)

Pacienti infikovaní *M. kansasii* mají pravděpodobně některou ze základních plicních komorbidit jako je kouření, silikóza, CHOPN, bronchiektázie a předchozí nebo současná infekce způsobená *M. tuberculosis*. Mezi další běžné komorbidity patří zneužívání alkoholu, HIV a malignity. V případě HIV negativních pacientů u *M. kansasii* nebyly identifikovány poruchy buněčné imunity. Oproti tomu při nákaze *M. tuberculosis* je častá imunokompromitující komorbidita. Vzhledem k podobnostem mezi těmito mykobakteriemi by měl lékař při diagnostice vycházet z epidemiologické situace. (Chalmers, 2018; Johnston, 2017)

Klíčové pro správnou diagnózu jsou radiologické vyšetření, zhodnocení klinických příznaků a výsledek kultivace. Kultivace se považuje za pozitivní, pokud vyjde u dvou po sobě jdoucích kultivacích pozitivní nárůst ze sputa, pokud vyjde pozitivní kultivace po bronchoskopii nebo pokud vyjde pozitivní kultivace sputa společně s patologií. (Johnson, 2014; Johnston, 2017)

Léčba u HIV negativních pacientů obecně dobře reaguje na nasazenou terapii. U jedinců, kteří jsou vnímavější na léčbu, může být sputum zbaveno mykobakterií do 4 měsíců od zahájení léčby (tzv. fáze sterilizace). Ve většině případů poté již nedochází k relapsu. Jedná se o nejkratší možnou dobu podávání ATB. Doporučené léky jsou rifampicin v kombinaci s ethambutolem po dobu 9 měsíců. Pakliže nedochází ke zlepšení

stavu může být léčba prodloužená až na 12 měsíců. V případě rezistence na rifampicin se doporučuje nasadit tři různé typy antibiotik. Bývají nasazené vysoké dávky ethambutolu, isoniazidu, sulfametoxazolu a pyridoxinu v kombinaci s léčbou aminoglykosidy. (Chalmers, 2018; Johnston, 2017; Johnson, 2014)

Pacienti HIV pozitivní bývají vysoce rizikovou skupinou a před zavedením antiretrovirové terapie byl průměrný čas dožití od potvrzení diagnózy nákazou *M. kansasii* jeden rok. Nyní je prognóza lepší, ale stále jsou zde velká rizika. Ve většině případů, kdy dojde k nákaze touto mykobakterií, tak se u imunokompromitovaných pacientů jedná se o poslední stádium nemoci se značně poškozenou imunitou, a proto i dnes zůstává velké riziko smrti do jednoho roku od nákazy. Léky podávané u pacientů s HIV se shodují s těmi, které se podávají u jinak zdravých jedinců. Velké riziko tu ovšem představují kontraindikace s léky podávanými v rámci antiretrovirové terapie. Nebezpečí rifampicinu spočívá v tom, že některé jeho deriváty mají schopnost ovlivnit metabolismus jiných léčiv přes cytochrom P450, například proteázové inhibitory a nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy, tyto schopnosti poté mohou mít na svědomí rozvoj rezistence na léky proti HIV. Potenciálním zástupcem rifampicinu se podle některých studií ukázal rifabutin, klaritromycin. V současné době neexistuje žádný důkaz na podporu profylaxe při nákaze *M. kansasii*. (Johnston. 2017)

5.6.3.2 Plicní onemocnění způsobené *M. avium* komplex

Na počátku 80. let 20. století se komplex původně jmenoval MAI a zahrnoval pouze dva patogeny a to *M. avium* a *M. intracellulare*. Množství mykobakterií, které spadají do MAC nadále rostlo a došlo proto k přejmenování. K roku 2019 do tohoto komplexu patřili *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. colombiense*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. vulneris* a *M. yongonens*. V rámci komplexu jsou nejznámějšími a nejčastějšími lidskými patogeny *M. avium*, *M. intracellulare* a *M. chimaera*. Výskyt jednotlivých mykobakterií, které jsou součástí komplexu, je různý a mění se v závislosti na jednotlivých zemích. Příkladem může být *M. chimaera*, které je běžné v Německu, ale vzácně se vyskytuje v Severní Korey. (Daley, 2017; Kwon, 2019)

Organismy patřící do skupiny MAC jsou nejčastěji v přírodě izolovány z vody, půdy a domácího prachu. V případě vody nehraje roli, zda se jedná o přírodní zdroj nebo o vodu chemicky upravovanou. Díky silné buněčné stěně jsou tyto mykobakterie relativně

rezistentní vůči účinkům chloru, chloraminu a ozonu. V porovnání s *Pseudomonas aeruginosa* mají 40x větší ochranu proti působení chloru a oproti *Escherichia coli* je ochrana 100x větší. (Daley, 2017)

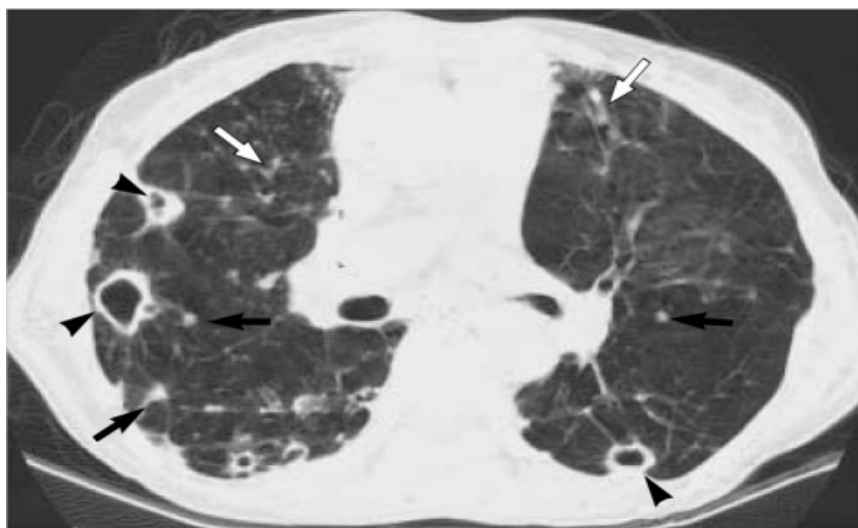
Dýchací cesty jsou nejběžnějším místem infekce způsobenou MAC u pacientů se zdravou imunitou. Úskalí diagnózy spočívá v rozmanitosti klinických projevů. Klinická manifestace nemoci může být od asymptomatické kolonizace přes indolentní infekci až po progresivní, symptomatické onemocnění. Pokud jsou ve vzorku detekovány mykobakterie patřící do MAC, nemusí to ihned znamenat, že se jedná o původce nemoci. To je rozdíl od tuberkulózy, kde výskyt *Mycobacterium tuberculosis* ihned potvrzuje diagnózu a je zahájena léčba. (Daley, 2017)

Onemocnění způsobené MAC má dvě hlavní podoby. První formou, která je pro MAC typická, je apikální fibrokavitární plicní onemocnění. Tato forma je typická spíše pro muže na přelomu 40. a 50. roku života, kteří v minulosti nebo i v současné době kouří cigarety a často nadměrně pijí alkohol. V plicích se vytváří dutiny, kavity, které jsou vyplněné vzduchem a na snímcích připomínají tuberkulózu (viz obr. 9). Pokud nedochází k léčbě, nemoc se v poměrně krátkém časovém období, jeden až dva roky, rozšíří a může mít za následek rozsáhlou kavitární destrukci plic a následně plicní selhání. (Griffith, 2007; Loebinger, 2017)



Obrázek 9 - Fibrokavitární forma onemocnění způsobené *M. avium* komplexem. Sken pořízený výpočetní tomografií s vysokým prostorovým rozlišením (HRCT) ukazuje velkou dutinu v levém plicním laloku (černá šipka) (zdroj: Bonaiti, 2015).

Druhou formou je fibronodulární bronchiectázie, při které dochází k chronickému rozšíření průdušek (viz obr. 10). Oproti první podobě onemocnění je toto typické pro ženy, které jsou již po menopauze a nekouří. Někdy bývá tato podoba onemocnění označována jako „syndrom Lady Windemere“ podle názvu divadelní hry Oscara Wilda. Často postihuje pravý střední lalok a *lingulu* (část levého horního plicního laloku). Nemoc má tendenci mít mnohem pomalejší vývoj a bývá zapotřebí dlouhodobější monitorování pacienta pro odhalení nemoci v řádu měsíců až let. Není známo, zda je rozšíření průdušek důvod rozvoje nemoci nebo následek. Pacienti s nodulárním/bronchiectatickým onemocněním plic mívají často další mikrobiologické nálezy spojené s bronchiectáziemi, např. pozitivní kultivace na výskyt *P. aeruginosa* a příležitostně na další NTM, jako je *M. abscessus*. Stále existuje ovšem řada kombinací, které nespádají mezi tyto dvě kategorie, a proto v některých studiích bývají např. nodulární bronchiectázie dělené na typ s nebo bez malých kavit v uzlicích. (Griffith, 2007; Loebinger, 2017)



Obrázek 10 - HRCT sken 69leté ženy s komplexním onemocněním *M. avium* intracellulare.

Transaxiální tenký řez (tloušťka 2,5 mm) získaný na úrovni bronchus intermedius ukazuje více kavitárních uzlin (hroty šípů) v obou plicích. Patrné jsou také malé uzlíky (černé šípky) a bronchiectázie (bílé šípky). (zdroj: Chung, 2005)

Pro potvrzení nákazy NTM je potřeba splnit jistá kritéria. Prvním kritériem je nutnost potvrdit plicní příznaky. Dále je třeba provést rentgen hrudníku a potvrdit nodulární nebo kavitární průsvity nebo provést HRCT, která ukazuje multifokální bronchiectázi s malými uzlíky (viz obrázky č. 9 a 10). Dalším kritériem je pozitivní kultivace z alespoň dvou oddělených vykašlaných vzorků sputa. U pacientů, kteří nemohou vykašlat sputum nebo jejichž sputum je při kultivaci trvale negativní, je možné

použit bronchoalveolární laváže nebo bronchiálního promývacího roztoku z postiženého plicního segmentu. A posledním kritériem je nutnost vyloučit jiné nemoci jako je např. tuberkulóza nebo mykotické infekce. (Sharma, 2020; Daley, 2017)

Léčba pacientů s pozitivním nálezem MAC se liší v závislosti na závažnosti onemocnění, předchozí léčbě a odolnosti kmene vůči různým lékům. Dle doporučení odborných společností American Thoracic Society/Infectious Diseases of America (ATS/IDSA) z roku 2007 by měli být kombinovány tři léky na bázi makrolidů (klaritromycin nebo azitromycin) s rifampicinem a ethambutolem podávané nejméně 12 měsíců poté, co je sputum negativní na přítomnost *M. avium* komplex. U pacientů s fibrokavitárním onemocněním je poté doporučeno léčbu rozšířit o parenterální léčiva jako je streptomycin a amikacin. Frekvence podávání léčiv se liší dle formy onemocnění. U kavitárního typu se doporučuje léky podávat denně, kdežto u bronchiektázie se léky podávají třikrát týdně. V roce 2017 vydala British thoracic society (BTS) pokyny, které se ve většině bodech shodují s doporučením z roku 2007 od ATS. Rozdílem je, že BTS nedoporučuje přerušovanou terapii u závažných případů a neomezují každodenní léčbu pouze na kavitární onemocnění. (Kwon, 2019; Loebinger, 2017)

5.6.4 Diseminované onemocnění

V 80. a 90. letech minulého století se diseminované onemocnění objevilo u velkého množství HIV pozitivních pacientů, což je hlavní skupina lidí, u kterých se toto onemocnění vyskytuje. Onemocnění je typické pro Spojené státy Americké a Evropu, v Africe je výskyt sporadický. Znakem, který bývá společný pro většinu nemocných, je nízký počet CD4+ lymfocytů (<50 buněk na mm³). Hlavními mykobakteriemi, které jsou za onemocnění zodpovědné, jsou součástí *M. avium* komplexu. Další mykobakterie se podílejí na rozvoji nemoci zřídka, ale mohou se na jejím rozvoji u HIV pozitivních podílet - *M. kansasii*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. celatum*, *M. malmoense*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum* a *M. haemophilum*. (Greenwood, 1999; Heifets, 2004)

Klinické příznaky onemocnění bývají často obecné a netypické. Patří mezi ně horečka, noční pocení, bolesti břicha, zvracení, hubnutí, splenomegalie a lymfadenopatie. Dále se objevují změny v organismu jako je anémie a zvýšená hladina kyselé fosfatázy v krvi. (Sharma, 2020)

Diagnostiku nemoci je vzhledem k nespecifičnosti příznaků nejlepší provádět z odebrané krve. Vzorek krve by měl být odebrán do zkumavky obsahující

polyanetholsulfonát sodný (SPS). SPS je složkou v kultivačních médiích používaných ke kultivaci bakterií ze vzorků krve od pacientů s podezřením na bakteriémií. Jednou z vlastností SPS je to, že zabraňuje zabíjení bakterií vrozenými humorálními a buněčnými faktory. Vzorek krve s SPS je potom možné využít k izolaci kultury, ke kvantitativní kultivaci pro zjištění množství bakterií v krvi nebo pro sledování reakce pacienta na probíhající či proběhlou léčbu. Vzorek by měl být naočkován na pevné médium, a zároveň i do tekutého média. (Palarasah, 2010; Heifets, 2004)

Předpokladem je, že místo vstupu bakterie do těla je střevo a příležitostně se může jednat o přenos plicemi s následnou hematogenní distribucí do těla. Zdroj nákazy není příliš dobře znám, ale pravděpodobně se jedná o spící infekci, která proběhla již v dětství a patogen v těle zůstal, nebo ke kontaktu s patogenem došlo v prostředí nedávno před onemocněním. (Greenwood, 1999; Sharma, 2020)

Výskyt diseminovaného onemocnění se v posledních letech v rozvinutých zemích snížil kvůli lepší antiretrovirové léčbě. Nedošlo ovšem k úplnému vymizení nemoci a MAC je stále oportunním patogenem nejčastěji ovlivňujícím pacienty s AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). (Heifets, 2004)

5.7 Diagnostika

Diagnostika onemocnění způsobných NTM je založená na souboru korespondujících klinických, laboratorních, radiologických, histologických, molekulárně genetických a kultivačních vyšetření. Diagnostická kritéria využívaná v současné době jsou nastavena na základě doporučení ATS/IDSA a České pneumologické a ftizeologické společnosti. (Královcová, 2019)

V případě podezření na nákazu netuberkulózními mykobakteriemi se nejdříve před potvrzením nákazy musí splnit kritéria v klinické i mikrobiologické diagnostice. Klinická kritéria, která musí být splněna, jsou tři. Prvním je, že pacient musí mít plicní příznaky. Druhé kritérium jsou nodulární nebo kavitární opacity na rentgenovém snímku hrudníku nebo HRCT sken ukazující multifokální bronchiektázie s několika malými uzlíky. Poslední, třetí kritérium, je nutnost vyloučení dalších diagnóz, např. TBC, *Sporothrix schenckii* atd. Z mikrobiologického hlediska je potřeba splnit alespoň jedno kritérium pro potvrzení diagnózy. Prvním mikrobiologickým kritériem je pozitivní kultivace z alespoň dvou samostatných vykašlaných vzorků sputa. Druhé kritérium je pozitivní kultivace alespoň z jedné bronchoalveolární laváže. A posledním

mikrobiologickým kritériem je transbronchiální nebo jiná biopsie s mykobakteriálními histopatologickými rysy a pozitivní kultivace NTM, nebo biopsie vykazující mykobakteriální histopatologické znaky a sputum či bronchoalveolární laváž s pozitivním testem na přítomnost NTM. (Provazník, 2016)

Vzhledem k tomu, že některé další bakterie se klinicky manifestují stejně, anebo velmi podobně jako NTM, musí být zohledněna při diferenciální diagnostice jiná onemocnění. Mezi tato onemocnění se řadí např. TBC, rekurentní plicní aspirace, bronchiektázie, histoplazmóza, aspergilóza a rakovina plic. V laboratoři potom musí být při podezření na NTM pečlivě provedeny testy na přítomnost mikroorganismů *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Nocardia* a *Aspergillus*. V případě pacientů s onemocněním kůže a měkkých tkání je důležité vzít v potaz možnou nákazu *Sporothrix schenckii* před potvrzením nákazy *M. marinum*. (Sharma, 2020)

Kritickým krokem při laboratorní diagnostice je správné získání vzorku. Důležité je během odběru, např. sputa, zabránit kontaminaci životního prostředí i osob přítomných při odběru. K vyloučení pozitivních výsledků u příležitostně vyskytujících se NTM v tracheobronchiálním traktu by se měly testovat alespoň tři vzorky sputa odebrané při různých příležitostech. Mimoplicní vzorky by měly být získávány přímo z příslušné léze nebo orgánů. Nástroje použité k odběru vzorků nesmí být kontaminované. Jakmile je vzorek převezen do laboratoře, musí být proces dekontaminace proveden v plně sterilizovaném uspořádání. Vzhledem k rezistenci NTM vůči běžným dezinfekcím je potřeba pečlivý výběr dezinfekčních prostředků. (Sharma, 2020)

5.7.1 Dekontaminace vzorku

Předtím, než bude vzorek mikroskopicky, kultivačně či amplifikačně vyšetřen, je potřeba provést dekontaminaci, homogenizaci a neutralizaci vzorku. Důležitým krokem je potlačení růstu průvodní nespecifické flóry. Vlastnosti, které se využívá, je relativní odolnost mykobakterií k anorganickým kyselinám a hydroxidu sodnému. (Amlerová, 2014)

5.7.1.1 Modifikovaná Petroffova metoda

Dekontaminace vzorku je prováděna NaOH, jehož koncentrace nesmí přesáhnout 4 %. Po přidání hydroxidu sodného se směs vzorku a hydroxidu promíchává a dochází

k homogenizaci. V případě, že se jedná o velmi hutný vzorek, jsou do zkumavky či kyvety přidávány sterilní skleněné kuličky. V průběhu tohoto kroku se vzorek centrifuguje a odlije se supernatant. Po homogenizaci vzorku je do odběrových nádobek se sedimentem přidáno neutralizační činidlo. Tímto činidlem může být destilovaná voda, vhodnější je ovšem použití fosfátového pufru o pH 6,8 nebo slabý roztok HCl (0,1 – 0,25%). Po neutralizaci vzorku se opět provede centrifugace vzorku k získání sedimentu. Opět dojde k slití supernatantu a k následné resuspendaci sedimentu v 0,5 – 1 ml vhodného rozpouštědla. (Amlerová, 2014; Tripathi, 2014; de Waard, 2007)

5.7.1.2 Dekontaminace kyselinami

Druhý způsob, kterým je možno dekontaminovat vzorek, je pomocí kyselin. Jedná se o náhradní, paralelní nebo následnou metodu poté, co je provedena dekontaminace 4% NaOH u vzorků s potencionálním výskytem pseudomonád. Hlavním materiálem je moč, sekční materiál, hnis, aspiráty, jiné purulentní tekutiny, stolice a vzorky z respiračního traktu pacientů s cystickou fibrózou. Oproti dekontaminaci 4% NaOH není tato metoda vhodná pro jiná vyšetření než pro mikroskopii a kultivaci. Kyseliny používané k dekontaminaci jsou 0,5M H₂SO₄, nebo 3% kyselina šťavelová. (Amlerová, 2014; de Waard, 2007)

5.7.1.3 NALC-NaOH metoda

Dekontaminace může být prováděna pomocí *N*-acetyl-L-cysteinu a NaOH. *N*-acetyl-L-cystein (NALC) je mukolytické činidlo, které v koncentracích 0,5 % až 2,0 % dokáže rychle natrávit sputum, a to i hutné sputum od pacientů s cystickou fibrózou. NaOH je poté přidáno na dekontaminaci vzorku. Výhodou použití metody NALC-NaOH je, že lze použít velmi dobré mukolytické činidlo se sníženými koncentracemi dekontaminačního činidla. (Morcillo, 2008; de Waard, 2007)

5.7.1.4 Ogawa – Kudohova metoda

Metoda byla poprvé představena v roce 1974 jako zjednodušená metoda pro dekontaminaci vzorku pro kultivaci mykobakterií. Oproti jiným metodám trvá pouze 3 až 4 minuty a není zapotřebí žádného technického vybavení (odstředivka, mikrobiologický bezpečnostní box atd.). Při této metodě se vzorek sputa nebere na vatovou tyčinku. Ta se dekontaminuje po dobu 2 minut v 4% roztoku NaOH a poté se přímo natře na pevné

kultivační médium. Jako kultivační médium se používá Ogawova půda na bázi vajec nebo mírně okyselená Löwensteinova-Jensenova půda (pH 6,6 – 6,8). Obě půdy jsou mírně kyselé, aby kompenzovaly pH inokula, které obsahuje 4% NaOH. Metoda prozatím nepatří mezi schválené postupy WHO. (Franco-Sotomayor, 2020; de Waard, 2007)

5.7.2 Mikroskopie

Nejrychlejší, nejjednodušší a nejlevnější metodou pro průkaz mykobakteriální infekce je mikroskopie. Rod *Mycobacterium*, stejně jako rod *Nocardia*, patří mezi acidorezistentní bakterie. Krom těchto bakterií se stejným způsobem barví i nebakteriální elementy. Mezi tyto patří např. bakteriální endospory, hlavička spermie, jaderná inkluzní tělíska při otravě olovem, *Cryptosporidium parvum*, vajíčka *Taenia saginata* a další. Ačkoliv je acidorezistence pozorována i u jiných bakterií, v historickém kontextu je tato metoda spojována s prokázáním přítomnosti *M. tuberculosis*. (Bayot, 2020; Somoskovi, 2002)

Acidorezistentní struktury se pro dobrou vizualizaci pod mikroskopem barví pomocí dvou hlavních metod, barvení karbolfuchsinem a flurochromový postup. Při barvení acidorezistentních bakterií karbolfuchsinem se dá postupovat dvěma způsoby, metodou dle Ziehl-Neelsena nebo Kinyounovou metodou. (Bayot, 2020)

Ziehl-Neelsenova metoda spočívá nejdříve v tepelné fixaci preparátu na podložním sklíčku. Poté se vzorek obarví karbolfuchsinem a fixuje se nad plamenem. Podložní sklíčko s preparátem se zahřívá do té doby, dokud nedojde k výstupu par. V případě, že by nedošlo k odpařování, nebylo by barvení účinné. Zahřívání vzorek se nesmí zahřát na bod varu. Dalším krokem je postupné odbarvení okyseleným alkoholem (1% HCl v 70% ethanolu), a to do té doby, dokud neodtéká pouze čirý alkohol. Preparát se znovu opláchně vodou a kontrastně se dobarví, buď methylenovou modří anebo malachitovou zelení. Kvůli zahřívání se této metodě přezdívá horká metoda. (Julák, 2015; Bednář 2016)

Při Kinyounově metodě se na zafixovaný vzorek mykobakterie na podložním sklíčku přidá karbolfuchsin. Takto barvený preparát se nechá inkubovat a poté se opatrně opláchně. Dále je třeba přidat odbarvovací reagentii, kterou je 3% kyselina chlorovodíková. Ta odstraní primární skvrnu a opláchně se. Třetím krokem je nanesení kontrastního barviva methylenové modří a opláchnutí zbytku barviva. Nakonec se

preparát nechá zaschnout a pozoruje se pod světelným mikroskopem. Pod mikroskopem se poté jeví mykobakterie jako růžové a ostatní neacidorezistentní bakterie a podkladový materiál jsou zbarvené modře. (Wanger, 2017)

Metodu lze v případě potřeby modifikovat. Místo HCl je při modifikaci použita 5% kyselina sírová. Díky této modifikaci mohou být pomocí Kinyounovy metody barveny i další bakterie. Mezi takto barvitelné bakterie patří *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp., *Tsukamurella* spp. a *Gordoni* spp. Tyto bakterie při klasickém postupu nejsou schopny kvůli HCl udržet karbolfuchsin. Zároveň lze díky barvení 5% H₂SO₄ od sebe rozeznat *Nocardia* spp. a *Streptomyces* spp. Oba druhy se při barvení dle Grama jeví jako gram pozitivní vláknité tyčky. Při použití modifikované Kinyounovy metody se *Nocardia* spp. zbarví, kdežto *Streptomyces* spp. ne. (Wanger, 2017)

Pod mikroskopem se acidorezistentní bakterie jeví jako červené tyčinky na zeleném/modrém pozadí (viz obrázek č. 11). Mohou mít i lehce zahnutý tvar, nepravidelně probarvené s tzv. Muchovými granuly a někdy se mohou vyskytovat ve shlucích. Hodnocení nálezu mykobakterií v mikroskopu po barvení dle Ziehl - Neelsena je shrnuto v tabulce č. 3. (Julák, 2015; Bednář 2016)



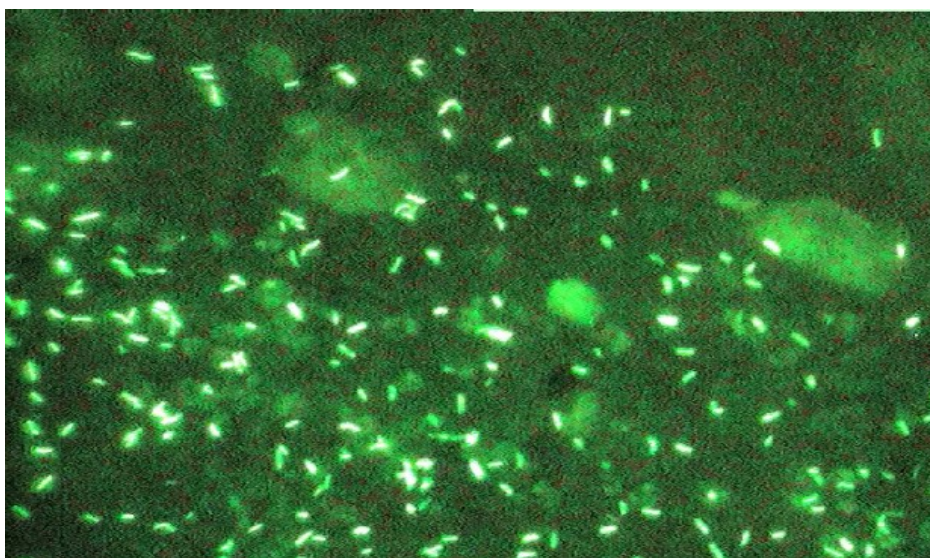
**Obrázek 11 - *M. tuberculosis* barvené metodou dle Ziehl – Neelsena (zvětšení 1000×).
Vzorek získán ze zánětlivého infiltrátu perikardu
(zdroj: Man, 2016).**

Tabulka 3 - Kvantitativní hodnocení nálezu mykobakterií v mikroskopickém preparátu – Ziehl-Neelsenovo barvení.

0	acidorezistentní tyčky (ART) nenalezeny (v 50 zorných polích) (nebo 1-9 ojedinělé ART (udává se počet v 50 zorných polích)
+	10 až 20 (v 50 zorných polích)
++	21 až 100 (tj. 1 až 10 v každém poli)
+++	Více než 100 (tj. více než 10 v každém poli)

(zdroj: Amlerová, 2014)

Alternativou pro acidorezistentní barvení je barvení fluorescenční směsí auraminu O a rhodaminu, po kterém jsou acidorezistentní tyčinky žluté, žlutozelené, na černém pozadí (viz obrázek č. 12). Výsledný nálezn v mikroskopu se poté hodnotí kvantitativně. Kvantitativní hodnocení nátěru po barvení pro fluorescenční mikroskopii je shrnuto v tabulce č. 4. (Julák, 2015; Bednář 2016)



Obrázek 12 - Fotografie z mikroskopu – nátěr sputa barvený auraminem O ukazující bacily TBC - fluorescenční mikroskopie (zvětšení 200×)
(zdroj: Khatun, 2011)

Tabulka 4 - Kvantitativní hodnocení nálezu mykobakterií v mikroskopu – fluorescenční barvení.

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

(zdroj: Amlerová, 2014)

5.7.3 Kultivace

Typickým znakem při kultivaci mykobakterií je dlouhá generační doba (18-24 hodin). S dlouhou generační dobou přímo souvisí i dlouhodobá kultivace, výjimkou jsou rychle rostoucí mykobakterie. První známky růstu se mohou objevit po 10–14 dnech, běžně se ale mykobakterie nechávají kultivovat po dobu 3 až 6 týdnů. V případě, že zkoumaný vzorek není sterilní, je potřeba provést úpravu vzorku zahrnující homogenizaci, dekontaminaci a zakoncentrování. Úspěšnost kultivace mykobakterií je v praxi limitována nepříznivými faktory transportu vzorku k vyšetření, kvalitou půd, a hlavně dekontaminačními postupy používanými k odstranění bakteriální flóry, která se v patologickém materiálu také vyskytuje. V případě některých pacientů, např. pacientů s cystickou fibrózou, je vyžadována speciální úprava vzorku. U pacientů s cystickou fibrózou je v posledních letech pozorován postupný nárůst výskytu NTM. (Bednář, 1996; Ptáková, 2011; Julák, 2015; Greenwood, 1999; Van Ingen, 2013)

Na kultivaci se používají speciální média, jak tekutá, tak i pevná. Nejčastěji se používá pevná Löwensteinova-Jensenova půda, která je tvořena vaječnou emulzí v roztoku biogenních solí a glycerolu, koagulovaná při 85 °C. Hojně se také využívá tekutá Šulova půda, která kromě biogenních solí a glycerolu obsahuje také kaseinový hydrolyzát a hovězí sérum jako zdroje dusíku. Tyto půdy mají speciální složení, které je příznivé pro růst mykobakterií. Kultivace probíhá u většiny mykobakterií při teplotě 37 °C, ideálně v atmosféře s 5 % CO₂ a odečítá se po třech, šesti a dvanácti týdnech. Výsledek kultivace se hodnotí kvantitativně a dále se hodnotí velikost, vzhled a pigmentace kolonií (viz. tabulka 5). (Bednář, 1996; Ptáková, 2011; Julák, 2015; Greenwood, 1999)

Tabulka 5 - Kvantitativní hodnocení kultivace NTM.

-	1 až 9 kolonií
+	10 až 19 kolonií
++	20 až 99 kolonií
+++	více než 100

(zdroj: Bednář, 1996)

Kultivačně náročnými druhy, které potřebují speciálně upravené půdy, jsou *Mycobacterium genavense* a *Mycobacterium haemophilum*. *M. genavense* využívá ke

svému růstu mykobaktin *J. M. haemophilum* vyžaduje při kultivaci hemin nebo jiné směsi obsahující železo. V případě *Mycobacterium marinum* se kultivace provádí při teplotě 25 °C–27 °C. (Bednář, 1996; Ptáková, 2011; Julák, 2015; Greenwood, 1999)

5.7.4 Identifikace jednotlivých druhů NTM

5.7.4.1 Biochemické testy

Při využití biochemických testů k identifikaci netuberkulózních mykobakterií se vychází ze schopnosti NTM přeměnit přidanou látku na specifický produkt. K tomu se využívají v tomto případě testy s niacinem, dále testy na redukci dusičnanů, zjištění katalázové aktivity, test ureázy, test pyrazinamidázy, schopnost růstu v přítomnosti kyseliny p-nitrobenzoové a hydrazidu thiofenu 2-karboxylové kyseliny. Vzhledem k tomu, že se jedná o testy, které jsou časově náročné a často i těžkopádné, nejsou již tolik využívány. Pomocí těchto testů lze určit, zda se jedná o *M. tuberculosis* nebo jinou netuberkulózní mykobakterii, případně u některých druhů je schopen biochemický test detekovat o kterou. Biochemické testy se také kvůli neschopnosti rozlišení jednotlivých druhů NTM již tolik nepoužívají. (Forbes, 2018)

5.7.4.2 HPLC

K identifikaci netuberkulózních mykobakterií se v minulost používala analýza mykolové kyseliny na bázi vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Poprvé byla navrhována k identifikaci v roce 1985. Touto metodou lze identifikovat pomalu rostoucí netuberkulózní mykobakterie, jako jsou MAC a *M. kansasii*. Metoda je při přesné identifikaci rychle rostoucích NTM méně konkrétní. HPLC má nízkou rozlišovací schopnost identifikovat blízké příbuzné druhy pomalu rostoucích mykobakterií a rychle rostoucích mykobakterií. Stejně jako biochemické testy se ani metoda HPLC v dnešní době už pro identifikaci NTM nepoužívá. (Forbes, 2018; Sharma, 2020)

5.7.4.3 Molekulárně genetické metody

Dnes již rutinně využívanou molekulárně genetickou metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR). Touto metodou dojde k amplifikaci vzorku a následně je vzorek analyzován. V případě analýzy NTM se provádí PCR-RFLP, polymerázová řetězová

reakce – analýza polymorfismu restrikčních fragmentů, při které dojde k analýze vzorů pásů omezených fragmentů genu *hsp65*. Tyto fragmenty jsou specifické pro jednotlivé druhy netuberkulózních mykobakterií. Nevýhodou je časová náročnost, omezení analýzy na malou část genomu a potřeba školeného personálu. Některé druhy NTM mohou sdílet identické vzory RFLP, tudíž nelze metodu využít na definitivní identifikaci druhů. (Sharma, 2020)

Molekulární techniky používané k identifikaci mykobakterií zahrnují přímou hybridizaci pomocí sond a techniky založené na sekvenování DNA nebo RNA. Nejčastějším cílem při identifikaci sondou je rRNA, a to hlavně kvůli jejímu vysokému počtu kopií v bakteriích. Velké množství kopií zvyšuje citlivost detekce, a tím i účinnost metody. Komerčně dostupné sondy jsou pro *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. goodii*, *M. kansasii* a MAC. Metody založené na sondách jsou dražší než jiné metody, mají ovšem zvýšenou přesnost a jsou rychleji proveditelné v porovnání např. s kultivací. Nebezpečím jsou falešně pozitivní a falešně negativní výsledky, ke kterým může dojít kvůli případnému výskytu polymorfismů. Polymorfismy mohou bránit správnému napojení sond. Dalším důvodem falešně pozitivních a negativních výsledků je možná příbuznost sekvencí mezi jednotlivými druhy NTM. Velkou nevýhodou je i omezený počet komerčních sond. (Forbes, 2018)

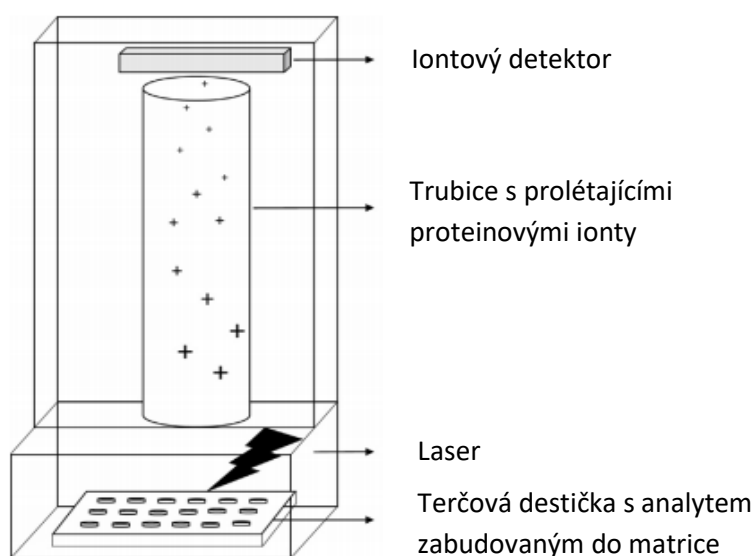
V současnosti je nejvíce uznávanou metodou využívanou k identifikaci druhů a poddruhů netuberkulózních mykobakterií sekvenování DNA. Před identifikací zkoumané mykobakterie je potřeba provést její kultivaci. K identifikaci NTM podle přítomné sekvence se nejčastěji využívá gen 16S rRNA, ale je možné využít i genů jiných, např. *rpoB* a *hsp65*. Nejčastěji využívaný gen 16S rRNA kóduje vysoce konzervovanou rRNA spojenou s malou podjednotkou ribozomu a je často používán pro identifikaci druhů a taxonomii. Ve výzkumu jsou k dispozici komerčně dostupné soupravy pro sekvenování 16S rRNA, ale většina klinických laboratoří používá protokoly vyvinuté v laboratoři. Některé druhy mykobakterií nelze rozeznat sekvenováním genu 16S rRNA, a proto se využívají geny jiné. Mezi takto nerozlišitelné mykobakterie se řadí *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. senegalense*, *M. conceptionense*, *M. farcinogenes*, *M. houstonense*, *M. murale*, *M. tokaiense*, *M. mucogenicum*, *M. phocaicum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. porcinum* a *M. fortuitum*. (Forbes, 2018)

Metodou cíleného sekvenování jednoho genu lze identifikovat přibližný počet druhů NTM ve vzorku, ale nemusí dojít k rozlišení jednotlivých druhů majících blízkou genetickou podobnost. Upřednostňována je typizace sekvencí více lokusů, jelikož touto metodou je sekvenováno větší množství konzervovaných genů a díky analýze většího množství genů jsou druhy NTM identifikovány přesněji. Vzhledem k nákladnosti metody a potřebě odborného personálu, nebývá metoda sekvenování DNA k dispozici v rutinních laboratořích. (Sharma, 2020)

5.7.4.4 Hmotností spektrometrie

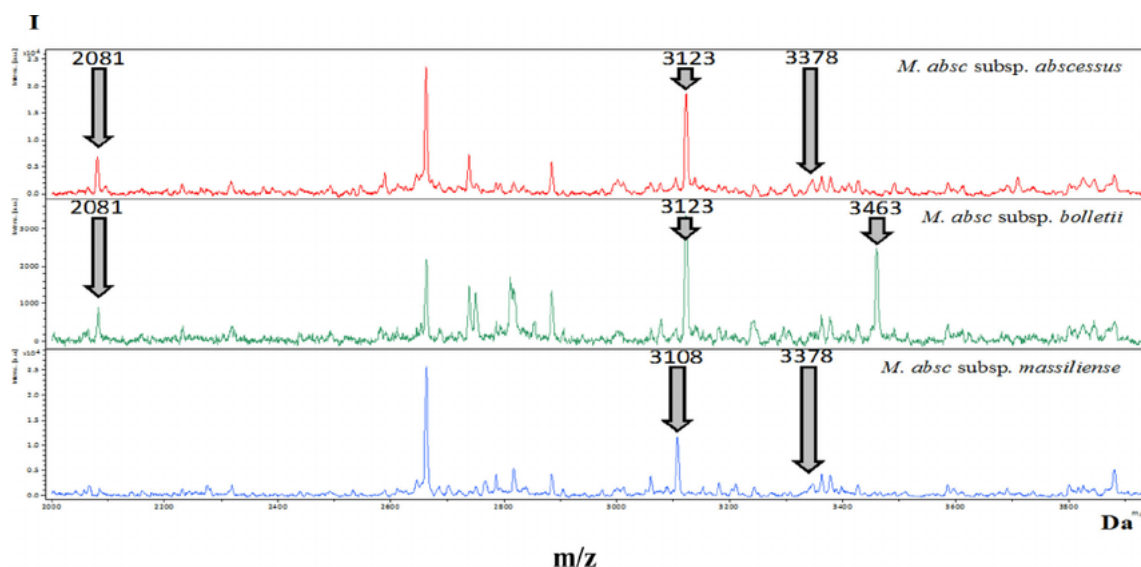
Způsobem, jak identifikovat jednotlivé druhy netuberkulózní mykobakterií, je pomocí metody MALDI – TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry). Jedná se o rychlou a efektivní metodu, díky které jsme schopni identifikovat o jakou bakterii, plíseň, kvasinku či houbu, se jedná. Hlavní výhodou je vysoká přesnost a aplikovatelnost na velké množství mikroorganismů. Z ekonomického hlediska se jedná o méně nákladné vyšetření, pořizovací cena stroje je ale vyšší. Technikou MALDI – TOF je možno identifikovat přibližně sto šedesát druhů NTM. Stejně jako jiné techniky, ani tato nesvede od sebe rozlišit úzce příbuzné druhy NTM. (Martin, 2017; Jurinke, 2004; Sharma, 2020)

Vzorek mykobakterií, odebraný z kultivační půdy, se na rozdíl od jiných bakterií nejdříve kvůli snížení rizika nákazy inaktivuje. Poté je potřeba pomocí různých činidel narušit shluky mykobakterií, rozbít buněčnou stěnu a extrahovat buněčné proteiny před provedením MALDI – TOF. Důvodem těchto příprav je voskovitá hydrofobní buněčná stěna mykobakterií. Po přípravě se vzorek nanese na pracovní destičku, přidá se matrice a nechají se společně zaschnout. Na jednotlivá okénka destičky pulzuje nanosekundový laserový paprsek z hmotnostního spektrometru MALDI – TOF. Schéma fungování MALDI – TOF je znázorněno na obr. 13. Po ozáření dojde k odpařování a ionizaci proteinových molekul, které jsou silou elektrostatického pole vtahovány do vakuové letové trubice. Ionty, na základě jejich poměru hmoty k náboji, cestují trubicí různou rychlostí. Doba, jakou jednotlivé ionty letí trubicí, se měří a následně je přepočítána na poměr molekulové hmotnosti a náboje. (Martin, 2017; Jurinke, 2004; Sharma, 2020)



Obrázek 13 - Schéma fungování MALDI-TOF (zdroj: Martin, 2017)

Výstupem měření jsou hmotnostní spektra (viz obr. 14). Na spektru bývá 100–200 vrcholů, které představují ribozomální proteiny, proteiny vázající nukleové kyseliny a proteiny tepelného šoku. Spektra získaná analýzou jsou pro velký počet mikroorganismů druhově specifická a lze je využít pro identifikaci bakterie. Jednotlivá spektra jsou porovnávána s databází, ve které jsou uložena referenční hmotnostní spektra identifikátorů pro jednotlivé kmeny mikroorganismů získaná opakovanou analýzou referenčních kmenů. (Martin, 2017; Jurinke, 2004; Sharma, 2020)



Obrázek 14 - Spektrální profily MALDI – TOF a charakteristické píky pro každý ze tří poddruhů *M. abscessus*.

Přesná analýza pomocí softwaru ClinProTool zvýraznila pět diskriminačních píků (m/z 2081, 3123, 3378, 3463, a 3378). (zdroj: Fangous, 2014)

V případě identifikace mykobakterií se jako způsob urychlení metody dá využít analýza mykobakterií kultivovaných v tekuté půdě. Tento proces zahrnuje rizika jako je přítomnost proteinů v samotném médiu, které mohou ovlivnit spektrum, nutnost načasování analýzy MALDI – TOF na moment, kdy je dosaženo dostatečného růstu mykobakterií. Při analýze mykobakterií z kapalné půdy je potřeba provést souběžně pro potvrzení výsledku hmotností spektrometrii vzorku z pevného média např. Löwensteinovy-Jensenovy půdy. (Martin, 2017; Jurinke, 2004; Sharma, 2020)

5.7.5 Testování citlivosti

Po klinické identifikaci netuberkulózní mykobakterie je třeba vyhodnotit správnou léčbu a vyloučit případnou rezistenci na podávaná antibiotika. V případě, že pacient i po tříměsíční léčbě vychází pozitivně v kultivaci, mikroskopii a dalších testech, je třeba provést vyšetření na citlivost znovu. Toto testování je kontroverzní kvůli rozporu mezi citlivostí *in vitro* a reakcí na léčbu. Nejdříve se zjišťuje, zda je zkoumaný kmen citlivý na základní antituberkulotika – INH (isoniazid, isonikotinylhydrazid), RIF (rifampicin), EMB (ethambutol), PZA (pyrazinamid), STM (streptomycin). V případě polyrezistence se testují další antibakteriální látky jako jsou fluorochinolony (např. ofloxacin, ciprofloxacin (CIP)), rifabutin, ethionamid, klaritromycin, aminoglykosidy (kanamycin, amikacin), kapreomycin, klofazimin a cykloserin. Stejně látky jsou testované v případě stanovení rezistence u *M. tuberculosis*. Při stanovování citlivosti NTM mohou být použity i další antituberkulotika. (Amlerová, 2014)

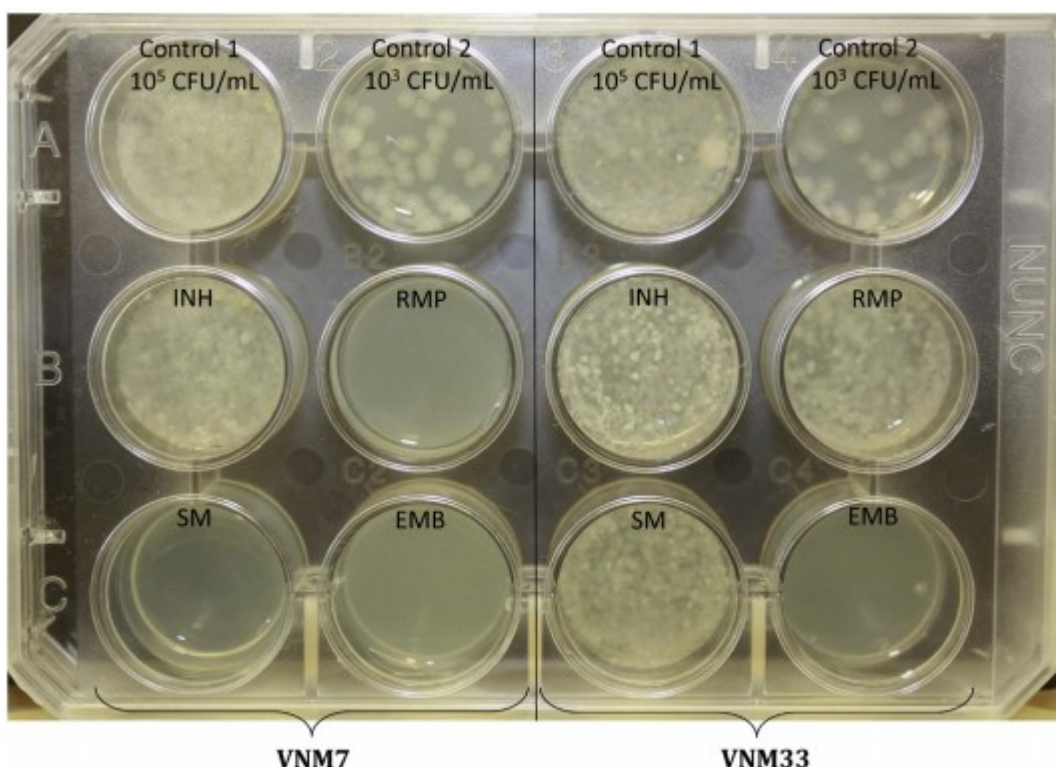
5.7.5.1 Proporční metoda dle Canettiho

Touto metodou se stanovuje nejčastěji citlivost na základních pět antituberkulotik (INH, RIF, EMB, PZA, STM). Metoda je založená na principu porovnávání růstu mykobakterií na Löwenstein-Jensenových vaječných půdách. V půdách jsou tzv. kritické koncentrace antituberkulotik, což jsou nejnižší koncentrace látek, které mají schopnost inhibovat kmeny, které nikdy nebyly v kontaktu s antituberkulotikem. Současně ale neinhibuje izoláty od pacientů, kteří se klinicky nelepší po nasazení léčby. Při testu je vždy provedena negativní kontrola na půdě bez přítomnosti léčiva. Odečet se provádí po 3–4 týdnech inkubace, případně se doba kultivace odvíjí podle růstu bakterie na kontrolní půdě bez léků. Teplota, při které se kultivuje, je uzpůsobená požadavkům jednotlivých

NTM např. *M. avium* při 42 °C, *M. marinum* a *M. chelonae* při teplotě 28-30 °C, *M. xenopi* při 45°C.

K dispozici jsou na provedení testu komerčně vyráběné soupravy s již naředěnou kritickou koncentrací léků. Tato koncentrace je: INH - 0,2 mg/l, RIF - 40 mg/l, STM - 4 mg/l, EMB – 2 mg/l, PZA - 400 mg/l. Z dalších antibiotik jsou testované kanamycin – 20 mg/l, cykloserin - 40 mg/l, kapreomycin - 40 mg/l a ethionamid - 40 mg/l.

Výsledné hodnoty testu se odráží od tzv. kritické proporce (x %). Kritická proporce rezistentních zárodků je 1 %. V případě, že je více než 1 % populace bakterií při *in vitro* testování vůči léku odolné, je menší pravděpodobnost, že klinická léčba tímto léčivem bude úspěšná. V případě, že je hodnota x % menší nebo se rovná 1, hodnotí se kmen jako citlivý. Pokud je hodnota x % větší než 1, je kmen hodnocený jako rezistentní. V případě nedostatečného růstu inokula je potřeba test znovu zopakovat. Nedostatečný růst se pozná podle počtu kolonií v největším očkovaném inokulu. Počet kolonií by měl být větší než 20 kolonií. Testování by se v tomto případě mělo provést s větším inokulem. Výsledky testování na lékovou citlivost jsou patrné na obr. č. 15. (Amlerová, 2014)



Obrázek 15 - Výsledky testování na lékovou citlivost
VNM7: izolát *M. tuberculosis* rezistentní na INH. VNM33: izolát *M. tuberculosis* rezistentní na INH, RIF, STM. Fotografie z 11. dne kultivace. V řadě A se nachází pozitivní kontroly s *M. tuberculosis* v nárůstu 10^5 CFU/ml a s 10^3 CFU/ml.
(zdroj: Nguyen, 2015)

5.7.5.2 Kvantitativní difuzní a kvalitativní diluční metody

Odolnost bakterií vůči běžně používaným antibiotikům a stále častěji selhávající léčba infekcí, vyžadují přesné zjištění účinnosti léku na mikroorganismus. Jedním z důvodů rostoucího počtu rezistentních kmenů je nadužívání nebo špatné používání ATB. Pro zjištění účinnosti ATB na zkoumanou bakterii se využívají buď kvalitativní, difuzní metody nebo kvantitativní, diluční metody. (Kowalska – Krochmal, 2021)

Nejpoužívanější metodou kvalitativního stanovení účinnosti antibiotik je diskový difuzní test. Metodou nelze měřit stupeň citlivosti, pouze zjišťuje, zda je nebo není daný kmen citlivý. Tato metoda je založena na principu umístění disku napuštěného ATB na předem naočkovaný agar. Antibiotikum při inkubaci difunduje do okolí. Rezistence nebo citlivost zkoumaného kmene k ATB se pozná podle vznikající inhibiční zóny kolem disku na agaru. Pokud je vzniklá inhibiční zóna větší, než stanovená hranice znamená to, že antibiotikum bude v léčbě úspěšné. Pakliže je vzniklá inhibiční zóna menší, kmen je proti testovanému ATB rezistentní a je vyloučena jeho účinnost. Výsledek se porovnává s tabulkovými standardy například s NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Hodnoty v tabulkách jsou uvedené takové, aby průměry inhibičních zón odpovídali break-pointům, tj. hraniční koncentraci zkoumaného ATB, která v těle pacienta bude léčebně účinná. (Bednář, 1996; Ústav laboratorní diagnostiky, 2021)

Kvantitativní, diluční metody jsou prováděny v agaru na Petriho miskách nebo v bujónu ve zkumavkách nebo v mikrotitračních destičkách. První dvě metody prováděné v Petriho miskách na agaru a ve zkumavkách v bujónu jsou používány především ve výzkumných laboratořích, a to hlavně kvůli své finanční náročnosti a nemožnosti aplikovat na velký počet vzorků. Metoda stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) zůstává zlatým standardem pro určení citlivosti netuberkulózních mykobakterií na antituberkulotika. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismu. Tyto metody se také označují jako kvantitativní testy citlivosti, protože výsledky jsou vyjádřeny číselně. Kvantitativní výsledky lze převést na kvalitativní – citlivé mykobakterie, středně citlivé a rezistentní. (Murray, 2015; Wikler, 2006)

Testování na mikrotitračních destičkách je prováděno ve většině klinických laboratořích zcela rutinně. Testy prováděny na těchto destičkách jsou v dnešní době již

plně automatizované. K dostání jsou destičky s různými kombinacemi ATB již od výrobce a lze je i kombinovat s biochemickými testy pro současnou identifikaci bakterie. ATB přítomná v jednotlivých jamkách jsou v suchém stavu což prodlužuje jejich životnost. (Murray, 2015; Wikler, 2006)

5.8 Rezistence

5.8.1 Buněčná stěna, poriny a efluxní pumpy

Velkou roli v rezistenci mykobakterií na podávaná léčiva má buněčná stěna bakterie, která je silně hydrofobní a neproniknutelná. Pro udržení vlastností stěny a rezistentního fenotypu je důležitých několik genů a proteinů. Mezi tyto struktury patří protein kináza G, *whiB7*, *mtrAB*, *fbpA* a *asnB* v *Mycobacterium smegmatis*, které slouží jako modelový organismus pro rod *Mycobacterium* (viz obr. 16). V případě narušení funkčnosti těchto genů by došlo k redukci hydrofobicity buněčné stěny a ke zvýšení citlivosti na lipofilní antibiotika včetně rifampicinu, makrolidů, ciprofloxacinu, vankomycinu, imipenemu a penicilinů. (Pereira, 2020; Van Ingen, 2012; T 2020)

Molekuly jsou do mykobakterie částečně transportovány pomocí porinů. Příkladem je porin *mspA* u *Mycobacterium smegmatis*, který byl rozsáhle studován a jeho aktivita přímo ovlivňuje náchylnost k malým hydrofilním molekulám antibiotik (viz obr. 16). Mezi tyto molekuly se řadí norfloxacin, chloramfenikol a β -laktamová antibiotika, ale také hydrofobní vankomycin, erytromycin a rifampicin. (Pereira, 2020; Van Ingen, 2012)

Kromě silné buněčné stěny a porinů mají NTM také efluxní pumpy, které brání akumulaci léků uvnitř bakterie. Efluxní pumpy se řadí do pěti nadrodin, jmenovitě MFS – Major Facilitator Superfamily, ABC – ATP – Binding-Cassette (ATP – adenosintrifosfát), SMR – small multidrug resistance, RND – Resistance Nodulation cell Division a MATE – Multidrug And Toxic compound Extrusion. Každá z těchto nadrodin má svůj vlastní mechanismus účinku a princip na základě kterého fungují. V MAC jsou nadrodiny ABC a MFS spojené s rezistencí na makrolidy, u *M. abscessus* mohou efluxní pumpy RND za rezistenci na klofazimin a bedachilin. Nadměrná exprese pump MFS u *M. abscessus* může za rezistenci vůči klaritromycinu. Nejlépe popsání efluxní pumpy u NTM jsou *tap*, *tetV*, *lfrA* a *efpA* (viz obr. 16). (Pereira, 2020; Van Ingen, 2012)

5.8.2 Biotransformace uvnitř bakterie

Biotransformace antimikrobiálních látek mykobakteriemi byla popsána pro peniciliny, chinolony, aminoglykosidy a rifampicin. Při léčbě mykobakterióz se nikdy nepoužívá penicilin z důvodu přítomnosti β -laktamáz ve všech mykobakteriích. (Van Ingen, 2012)

Jeden ze způsobů biotransformace je acetylace a nitrosace norfloxacinu a ciprofloxacinu. Po acetylaci a nitrosaci dojde k tvorbě molekul, které mají až tisíckrát nižší antimykobakteriální aktivitu. (Van Ingen, 2012)

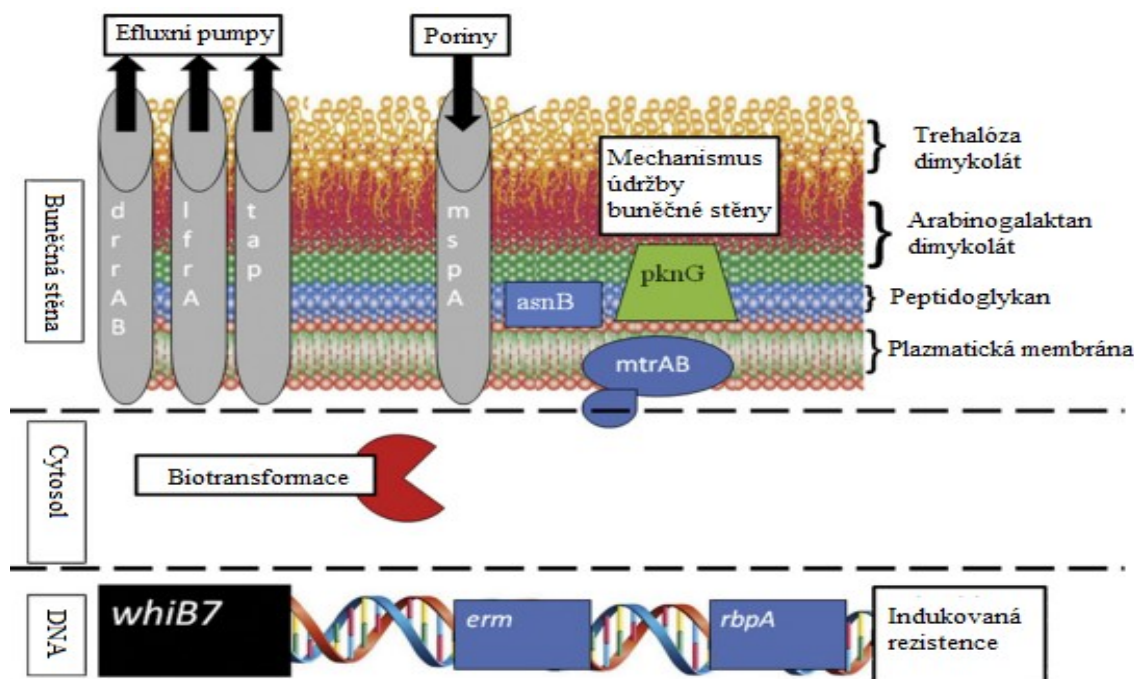
Citlivost na aminoglykosidy je ovlivněna třemi amidoglykosidy modifikujícími třídami enzymů – aminoglykosid *O*-nukleotidyltransferázy, aminoglykosid *O*-fosfotransferázy a aminoglykosid *N*-acetyltransferázy. U mykobakterií byl potvrzen výskyt aminoglykosid *O* – fosfotransferázy a aminoglykosid *N*-acetyltransferázy. Fosfotransferáza zabraňuje správným účinkům streptomycinu u *M. fortuitum* a u *M. abscessus*. *N*-acetyltransferáza byla identifikována ve větším množství mykobakterií např. *M. tuberculosis* komplex, *M. kansasii*, *M. smegmatis* atd. S největší pravděpodobností mají tyto aminoglykosidy konvertující enzymy na svědomí rezistenci vůči klinicky podávanému amikacinu, ovšem ne u všech mykobakterií byl tento jev potvrzen. Podobnost enzymů mezi jednotlivými mykobakteriemi poukazuje na možnost, že byly získané horizontálním genovým přenosem. (Pereira, 2020; Van Ingen, 2012)

5.8.3 Indukovaná rezistence

Neznámější indukovaná rezistence u mykobakterií je skupina genů *erm* (erythromycin resistance methylase) (viz obr. 16). *Erm* geny mají schopnost methylovat 23S rRNA, čímž dojde k navázání mono- nebo dimethylové skupiny a snížení vazby antibiotik na ribozomy. V závislosti na počtu připojených skupin se rozlišují dva fenotypy genů. Prvním je vysoká odolnost vůči linkosamidům a nízká až mírná rezistence na makrolidy a streptogramin B. (Pereira, 2020; Van Ingen, 2012)

Druhým fenotypem je vysoká odolnost vůči linkosamidům, makrolidům a streptograminu B. Tyto methylázy byly popsány u rychle rostoucích NTM např. *M. abscessus* a *M. fortuitum*, také u *M. tuberculosis*. Sekvenováním těchto genů se zabývá několik studií a předpokládá se, že na jeho základě bude možno předpovědět citlivost na ATB. S polymorfizmem v genu 23S rRNA jsou spojené i klinicky získaná rezistence na

makrolidy u několika mykobakterií (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. chelonae*) anebo s genem *embB* u *M. smegmatis*. (Pereira, 2020; Van Ingen, 2012)



Obrázek 16 - Přehled mykobakteriální buněčné stěny a determinant rezistence. (zdroj: Van Ingen, 2012)

5.9 Terapie

V případě léčby mykobakterióz způsobených NTM neexistují standardizované léčebné postupy a k léčbě se musí přistupovat individuálně. Léčbu je třeba uzpůsobit z důvodů velkého množství a různých vlastností mykobakteriálních kmenů s častou rezistencí na některá nebo všechna základní antituberkulotika. Samotná léčba po nákaze netuberkulózní mykobakterií je extrémně dlouhá, obtížná, a i přes přeléčení je vysoké riziko relapsu. Kvůli obtížnosti léčby se hledá alternativní způsob a bylo provedeno již několik studií na léčbu pomocí bakteriofágů, chelátorů železa nebo terapií zaměřenou na úpravu imunity nemocného hostitele. (Bednář, 1996; Pereira, 2020)

Předtím, než bude zahájena léčba, je třeba provést testy na citlivost k antibiotikům či antituberkulotikům. Na rozdíl od léčby tuberkulózy je při určení rezistence na zkoumanou látku u NTM brán menší zřetel. Často se stává, že léčiva při léčbě mykobakterióz způsobených atypickými mykobakteriemi fungují jinak *in vitro*, než *in vivo*. (Bednář, 1996; Pereira, 2020)

Při zahájení léčby se nejdříve nasadí v kombinaci základní antituberkulotika RIF, INH, EMB, STM, na které jsou cílené testy citlivosti. K výsledkům testů na rezistenci se přihlíží pouze v případě, že nasazená léčba ani po třech měsících není úspěšná. V tom případě se při nezměněném stavu pacienta nasadí takzvané náhradní léky, případně kombinace léků ze základní řady s léky náhradními. Léky využívané na léčbu mykobakterií jsou deriváty rifampicinu: rifabutin a rifapentin, fluorochinolony: ofloxacin, ciprofloxacin, některá z antituberkulotik druhé řady: ethionamid, cykloserin a kanamycin, a antibiotika: erytromycin, amikacin, cefalosporin, příp. antileprotické preparáty: klofazimin, sulfonamidy. (Bednář, 1996)

Většina pomalu rostoucích mykobakterií je při *in vitro* testování rezistentní vůči velkému množství antituberkulotik. Ovšem pokud se nakombinují, bývá léčba úspěšná. U pulmonálních onemocnění způsobených např. *M. avium* komplex, *M. xenopi*, *M. kansasii* a *M. malmoense* byla na základě několika kontrolovaných studií prokázána efektivní léčba pomocí rifampicinu a ethambutolu v kombinaci s klaritromycinem nebo ciprofloxacinem. Takto nasazená léčba trvá po dobu dvou let a v případě, že po roce není úspěšná a nedochází ke zlepšení zdravotního stavu pacienta, dojde k úpravě skladby léčiv. (Forbes, 2018; Greenwood, 1999)

Prognosticky nejzávažnější jsou nemoci způsobené *Mycobacterium avium*. Je tomu tak hlavně kvůli časté rezistenci na většinu základních antituberkulotik a v případě použití náhradních léků dojde v 50 % případů k recidivě. Délka léčby je až 2 roky. Pokud se jedná o onemocnění mimoplicní, přichází často v úvahu možnost kompletní chirurgické resekce. Tento způsob léčby bývá brán v potaz hlavně u kožních lézí a lymfadenopatií. Léčba je náročná i vzhledem k velké zátěži na játra a ledviny pacienta. Vzhledem k náročnosti léčby je třeba, aby na ni dohlížel pneumolog. (Bednář, 1996; Losse, 2019)

Plicní i mimoplicní onemocnění způsobené rychle rostoucími mykobakteriemi bývá úspěšně léčeno různou kombinací erytromycinu, novějšími makrolidy, sulfonamidy, trimetoprimem, amikacinem, gentamicinem, imipenem, rozšířeným spektrem cefalosporinů a fluorochinolonů. Do této skupiny patří *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* a *M. peregrinum*. Při keratitidě způsobené *M. chelonae* poměrně často dochází k relapsu a poté je třeba operativně odstranit postiženou tkáň. (Forbes, 2018; Greenwood, 1999)

V případě onemocnění způsobeného *M. marinum* se většinou i přes léčbu přistoupí k operativnímu řešení, a to hlavně v případě, pronikne-li mykobakterie do šlach a kloubů. Léčba léky spočívá v podání klaritromycinu ve spojení s EMB případně i s RIF. (Forbes, 2018; Greenwood, 1999)

V porovnání s tím je léčba tuberkulózy cílená a detailně popsána. Léčebné režimy jsou rozdělené na 2 fáze: iniciální a pokračovací. První, iniciální fáze, probíhá pod dohledem lékařů v ústavu a druhá, pokračovací fáze, je fází ambulantní. Celá léčba může probíhat ve třech různých režimech – krátkodobý, zkrácený nebo 12měsíční. Každý z těchto režimů má dané přesné složení antituberkulotik jak v iniciální, tak i v pokračovací fázi a jednotlivé kroky jsou detailně popsány a prostudovány. (Bednář, 1996)

5.9.1 Nové terapeutické látky

Vzhledem k rostoucí incidenci nemocí způsobených NTM je stále větší snaha nalézt nové a účinnější léky. Z léčiv poslední doby, které vykazují největší potenciál, je telacebec. Jedná se o nový antituberkulózní lék vyvinutý korejskou společností Qurient. Tento lék prokázal extrémně silnou aktivitu proti *Mycobacterium ulcerans* ve studiích na zvířatech. Při výzkumu došlo ke zkrácení doby léčby z 8 týdnů na 2 týdny. V lednu 2021 americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv udělil telacebecu označení „orphan drug designation“ (ODD). Nyní se plánuje klinická studie k vyhodnocení účinku léku u pacientů s vředem Buruli. (WHO, 2021)

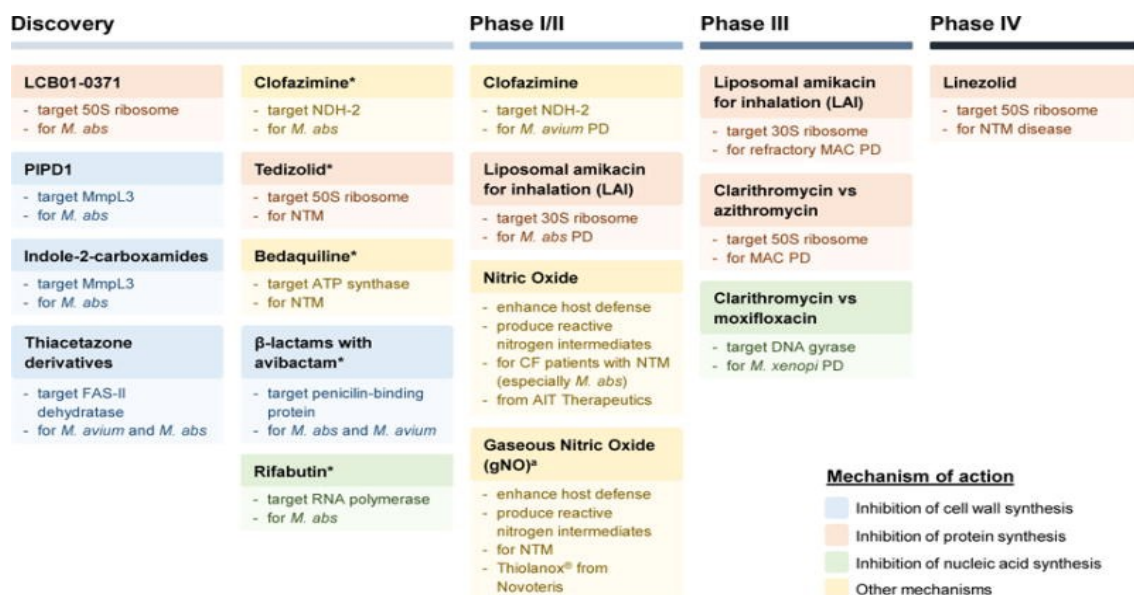
Dalším potenciálním léčivem, které je ve vývoji, je SPR720. Jedná se o antibiotikum, které vykazuje velký potenciál při klinických studiích. V případě, že by došlo ke schválení, jednalo by se o první antibiotikum cílené na plicní onemocnění způsobené NTM a zároveň na léčbu tuberkulózy. SPR720 patří do nové skupiny antibakteriálních látek, které cílí na enzymy nezbytné pro replikaci bakteriální DNA. (Spero, 2021)

Léčivem, které se také v současné době používá na léčbu tuberkulózy, je bedachilin. Spadá do kategorie diarylchinolinových antibiotik. Metabolismus účinku je založen na inhibici protonové pumpy mykobakteriální ATP syntázy, čímž dochází ke snížení produkce ATP. Přestože je účinek proti NTM menší než proti *M. tuberculosis*, vykazuje v *in vitro* studiích bakteriostatickou aktivitu hlavně proti MAC a *M. abscessus*

komplex. Při testech s tradičně užívanými ATB na léčbu onemocnění způsobeného NTM jako je např. klofazimin nedošlo k žádnému antagonismu ani synergismu. Naopak kombinace bedachininu a klofazimínu způsobila prodloužení bakteriostatického účinku. (Laudone, 2021)

Eravacyklin je nové fluorocyklinové antibiotikum, které se řadí mezi tetracykliny. Váže se na 30S ribozomální podjednotku, které brání začlenění aminokyselinových zbytků do peptidových řetězců a narušuje syntézu bakteriálních proteinů. V současné době se léčivo využívá pro léčbu komplikované břišní infekce způsobené bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae* nebo *Acinetobacter* spp. V několika málo studiích byl prokázán inhibiční účinek léku, pro zjištění jeho skutečného potenciálu je třeba provést mnohem větší počet studií. (Laudone, 2021)

Na obrázku níže je uvedený výpis léčiv, které jsou a byly ve vývoji pro léčbu plicního onemocnění způsobeného NTM. Léky ve fázi „I-IV“ pochází z webu ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov>). Zkratky: M. abs = *Mycobacterium abscessus*; MAC = *Mycobacterium avium* komplex; PD = plicní nemoc; CF = cystická fibróza; FAS-II = syntáza mastné kyseliny typu II; NDH-2 = NADH-chinon oxidoreduktáza typu II. (Wu, 2018)



Obrázek 17 - Léčiva v různých fázích klinického výzkumu určená pro léčbu plicního onemocnění způsobeného NTM (zdroj: Wu, 2018)

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Mikrodiluční bujónová metoda

Diluční metody lze provádět ve dvou možných provedeních. Prvním z nich je makrodiluční metoda, která se provádí ve zkumavkách s testovaným objemem větším než 1 ml. Druhou možností provedení je mikrodiluční metoda, která je prováděna v mikrotitračních destičkách. V praxi se využívá pro snadnější přípravu a provedení mikrodiluční bujónová metoda. Pro růst mykobakterie v jamce i zkumavce se používá bujón Middlebrook 7H9 s glycerolem a OADC suplementem. (EUCAST, 2019; Melter, 2014; Ústav laboratorní diagnostiky, 2021)

Při stanovení MIC pomocí mikrodiluční bujónové metody je využíváno dvojkové ředění zkoumaného ATB. Principem je, že se vždy v následující jamce ředí koncentrace na poloviční, například 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,1, 1,5, 0,75 atd. $\mu\text{g/ml}$. Každé ředění se zaočkuje standardizovanou koncentrací zkoumané mykobakterie a po inkubační době dojde k odečtu. Odečtem se stanovuje minimální inhibiční koncentrace, která vyjadřuje citlivost bakterie vůči ATB. Odečítá se první jamka s inhibovaným růstem bakterie. Mikroorganismus je označován dle The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) jako citlivý, rezistentní nebo intermediárně rezistentní k ATB na základě hodnoty breakpointu (mg/l). Hodnoty breakpointu jsou určovány podle mezinárodních organizací pro standardizaci Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) a EUCAST. (Urbášková, Žemličková, Hrabák, 2010; Murray, 2015; Wikler, 2006)

Mikrotitrační destička, ve které probíhá testování, se skládá z dvanácti sloupců a osmi řad, celkem devadesát šest jamek. Při testování je třeba mít v destičce přítomnou pozitivní a negativní kontrolu. Pozitivní kontrola slouží k potvrzení správného růstu mikroorganismu, kdežto negativní kontrola, která obsahuje pouze bujón, odhalí případnou kontaminaci. Ostatní jamky jsou využity pro samotné testování.

6.2 Testovací kmeny

6.2.1 *Mycobacterium aurum*

Mycobacterium aurum bylo poprvé popsáno jako nový druh v roce 1966. Jedná se o acidorezistentní, v přírodě se vyskytující mykobakterii, která se dle Runyona řadí do čtvrté kategorie netuberkulózních mykobakterií. Tato rychle rostoucí mykobakterie roste v oranžovo – žlutých koloniích. Buněčná stěna *M. aurum* obsahuje mykolové kyseliny, které jsou analogické s těmi u *M. tuberculosis*. Zároveň u těchto dvou mykobakterií existuje velká podobnost mezi citlivostí na antituberkulotika.

Díky rychlému růstu a nízké patogenitě je proto *M. aurum* používáno ve studiích antimikrobiální aktivity antituberkulotik jako náhrada za *M. tuberculosis*. Zároveň má *M. aurum* schopnost přežít v makrofázích, narozdíl od například *Mycobacterium smegmatis*. Z tohoto důvodu bývá používáno i pro screening průniku léčiv do buňky. Toto umožňuje dále zkoumat schopnost léčiva pronikat přes buněčné membrány a zjistit stabilitu léčiv uvnitř buňky. Ve většině případů není *M. aurum* pro člověka patogenní, ovšem pokud dojde ke snížení imunity může dojít k rozvoji onemocnění (Phelan, 2015; Tsukamura, 1966).



**Obrázek 18 - Růst *M. aurum* DSM 43999 na agaru Middlebrook 7H10.
(zdroj: DSMZ)**

6.2.2 *Mycobacterium smegmatis*

Mycobacterium smegmatis je acidorezistentní, rychle rostoucí, aerobní saprofytická bakterie. Ve velkém množství se vyskytuje v okolním prostředí, v laboratořích a může být izolována v kontaminovaných vzorcích. U zdravých jedinců nepředstavuje *M. smegmatis* zdravotní riziko, ovšem u imunosuprimovaných pacientů bylo popsáno několik případů nákazy. (Solovič, 2018)

M. smegmatis není schopno vstoupit do epitelálních buněk, nepřežívá v profesionálních fagocytech a nemá žádnou z dalších patogenních vlastností *M. tuberculosis*. Z těchto důvodů byla ignorována pro studium patogenity. Pro svůj rychlý růst, nepatogenitu a genetickou výbavu je vhodnou mykobakterií na studium obecných vlastností mykobakterií. Bylo např. zjištěno, že *M. smegmatis* má dvanáct z devatenácti virulentních genů společných s *M. tuberculosis*. Některé z těchto genů byly původně popsány jen u *M. tuberculosis*. Na základě genového sekvenování bylo zjištěno, že se nejspíše jedná o geny celého rodu. (Reyrat, 2001)

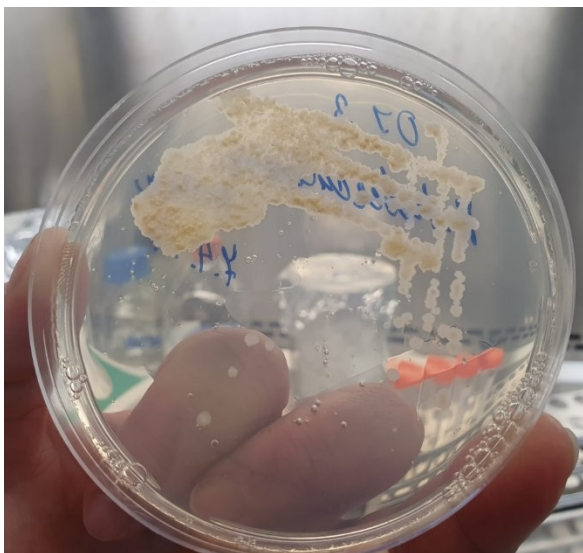


**Obrázek 19 - Růst *M. smegmatis* na TSY agaru.
(zdroj: Science Prof online)**

6.2.3 *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

Mycobacterium tuberculosis je nejznámější patogenní mykobakterií. Jedná se o acidorezistentní, aerobní bakterii, která má ve své buněčné stěně velké množství lipidů. Tuberkulóza je onemocnění ohrožující každý rok 1/3 lidské populace s 10 miliony nových případů. Důvodem, proč je z velké části úspěšná jako patogen, je její schopnost přetrvávat v latentní formě roky nebo dokonce desetiletí se současnou absencí příznaků. (Fitzgerald, 2015; WHO, 2020)

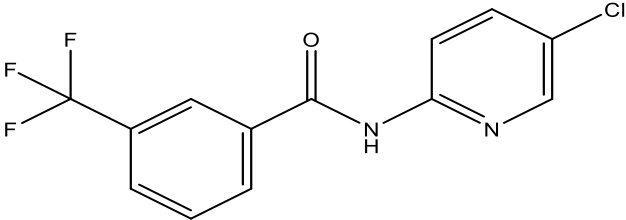
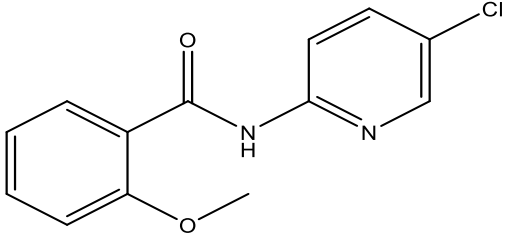
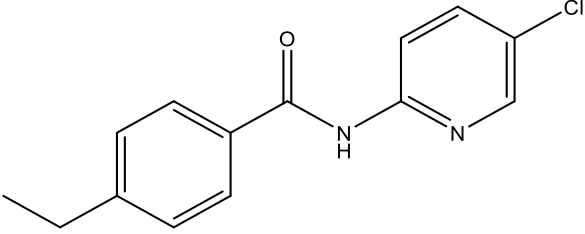
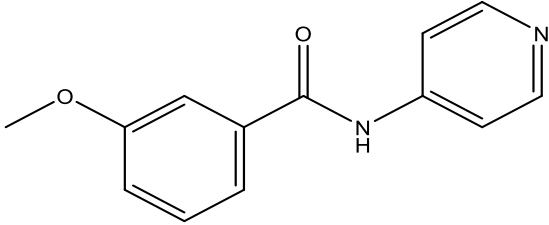
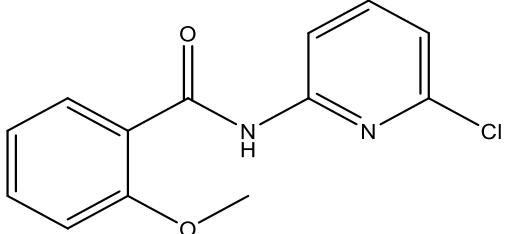
M. tbc H37Ra je jednou z nejčastěji používaných kontrol pro identifikaci *M. tuberculosis* v klinické laboratoři. Zároveň je zdrojem falešně pozitivních výsledků na přítomnost *M. tuberculosis* v důsledku křížové kontaminace. Vysoce oslabené kmeny H37Ra, jsou při testování použité, kvůli své nižší patogenitě. Byly získány sériovým pasážírováním klinického izolátu H37 laboratorním médiem. K odlišení H37Ra a klinicky izolované *M. tuberculosis* se využívá genotypizace insertu IS6110, který se u H37Ra vyskytuje v 19 a 15 kopiích. H37Ra je k testování výhodná z důvodů nižší pořizovací ceny a zároveň se s takto atenuovanou mykobakterií může pracovat v laboratoři s biosafety level 2 (Uniprot, 2020; Gonzalo-Asensio, 2018; Soto, 2002; Heinrichs, 2018).

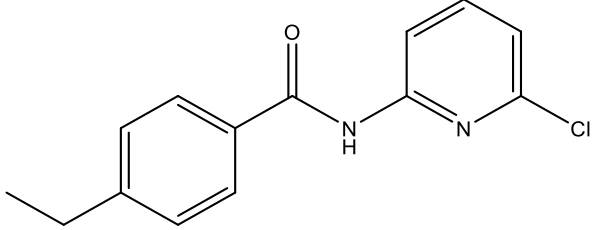
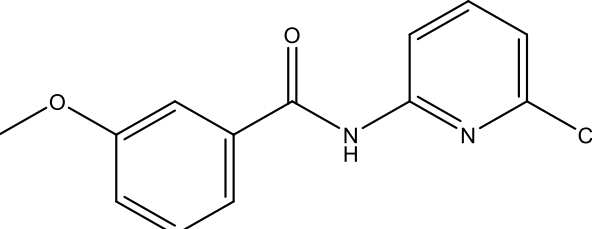
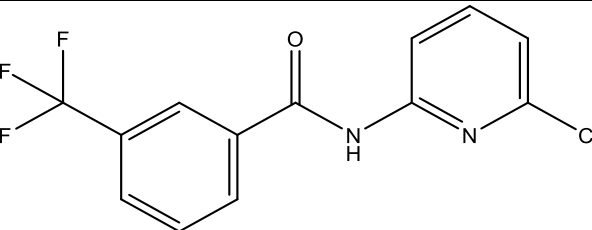
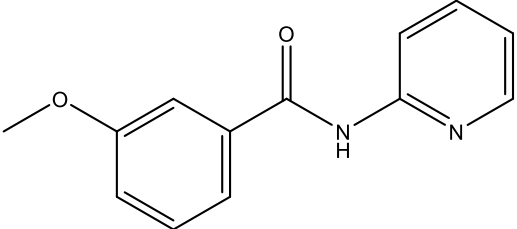
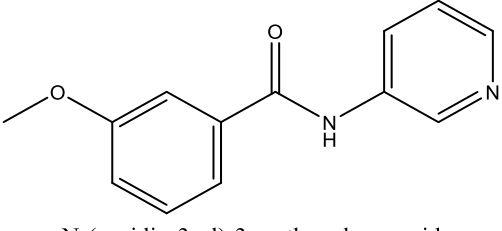
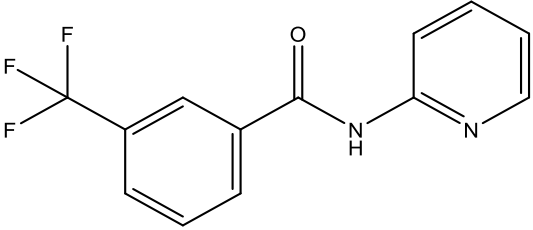


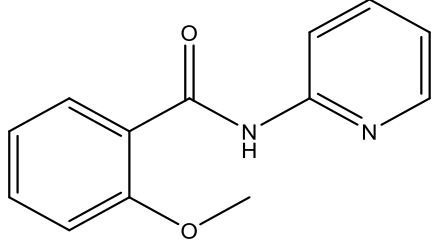
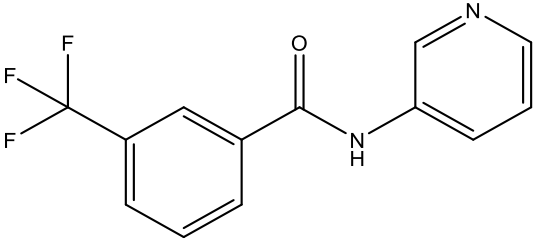
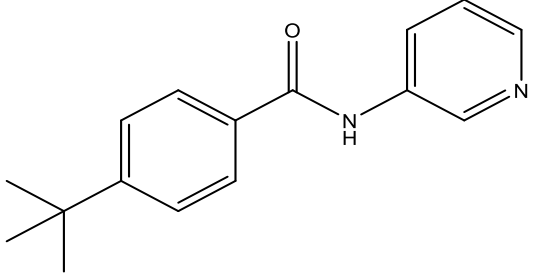
**Obrázek 20 - Růst *M. tuberculosis* H37Ra na Middlebrook 7H9 agaru
(zdroj: O. Jand'ourek)**

6.3 Testované látky

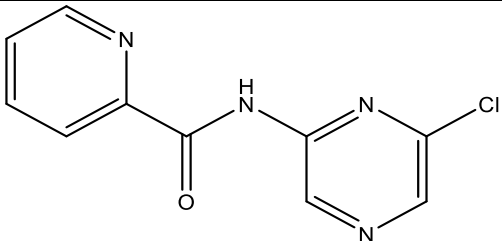
Tabulka 6 - 1. skupina látek (deriváty pyridin-2-ylbenzamidů)

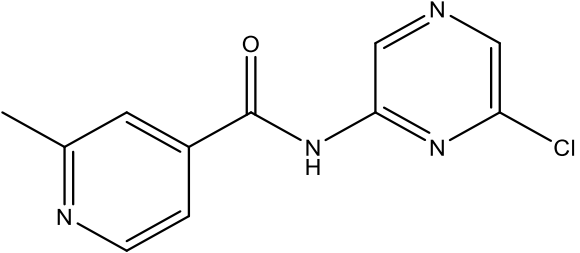
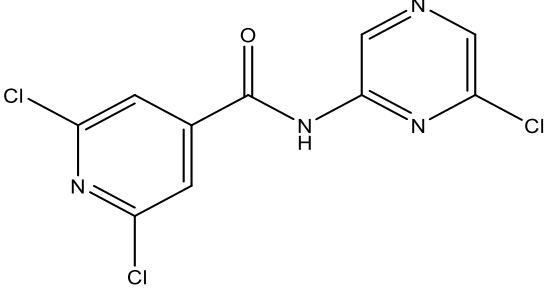
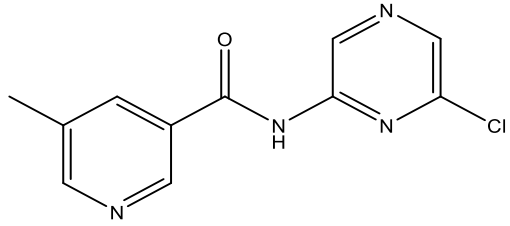
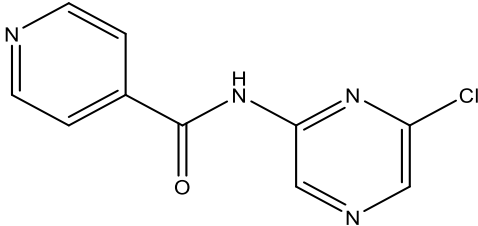
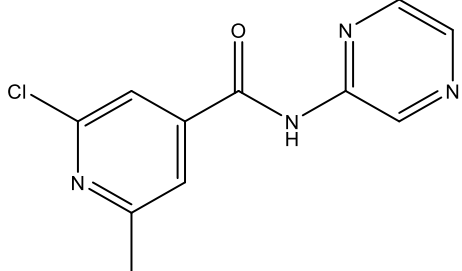
Kód látky	Vzorec a název	M _w	ClogP
A	 <p>N-(5-chloropyridin-2-yl)-3-(trifluoromethyl)benzamid</p>	300,67	3,75724
B	 <p>N-(5-chloropyridin-2-yl)-2-methoxybenzamid</p>	262,69	2,83335
C	 <p>N-(5-chloropyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid</p>	260,72	3,83736
D	 <p>N-(pyridin-4-yl)-3-methoxybenzamid</p>	228,25	2,10284
E	 <p>N-(6-chloropyridin-2-yl)-2-methoxybenzamid</p>	262,69	2,83335

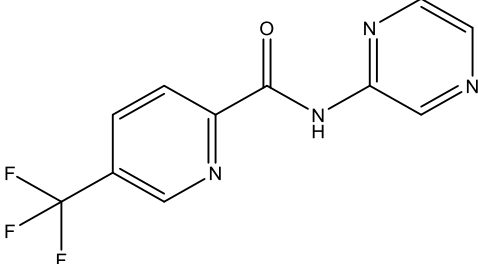
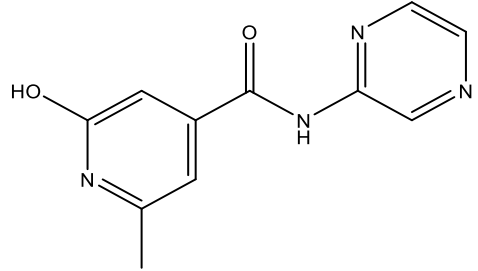
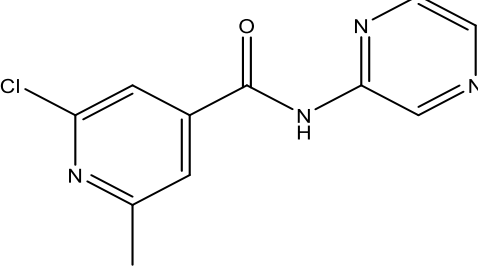
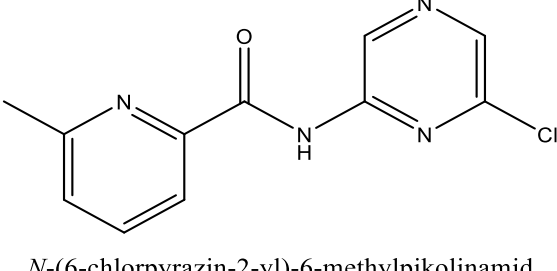
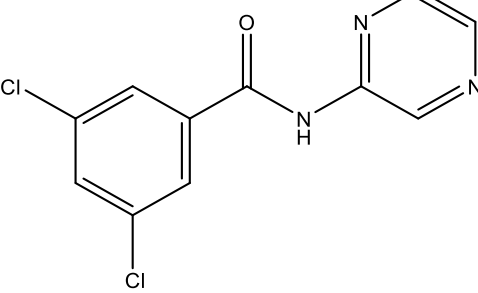
F	 <p>N-(6-chloropyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid</p>	260,72	3,83836
G	 <p>N-(6-chloropyridin-2-yl)-3-methoxybenzamid</p>	262,69	2,90335
H	 <p>N-(6-chloropyridin-2-yl)-3-(trifluoromethyl)benzamid</p>	300,67	3,75724
I	 <p>N-(pyridin-2-yl)-3-methoxybenzamid</p>	228,25	2,10284
J	 <p>N-(pyridin-3-yl)-3-methoxybenzamid</p>	228,25	2,10284
K	 <p>N-(pyridin-2-yl)-3-(trifluoromethyl)benzamid</p>	266,22	2,98748

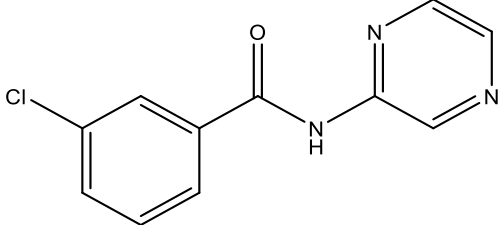
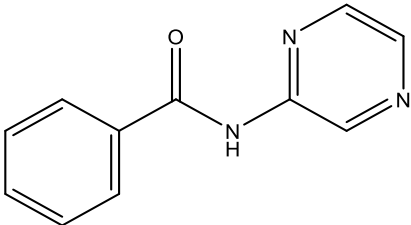
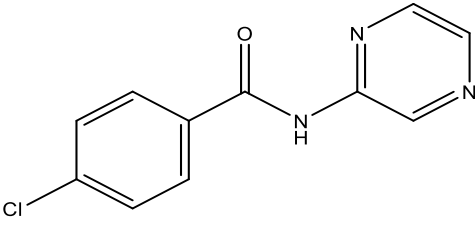
L	 <p>N-(pyridin-2-yl)-2-methoxybenzamid</p>	228,25	2,03284
M	 <p>N-(pyridin-3-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid</p>	266,22	2,98748
N	 <p>N-(pyridin-3-yl)-4-(<i>tert</i>-butyl)benzamid</p>	254,33	3,807

Tabulka 7 - 2. skupina látek (deriváty pyrazin-2-ylnikotinamidu, pikolinamidu a benzamidu)

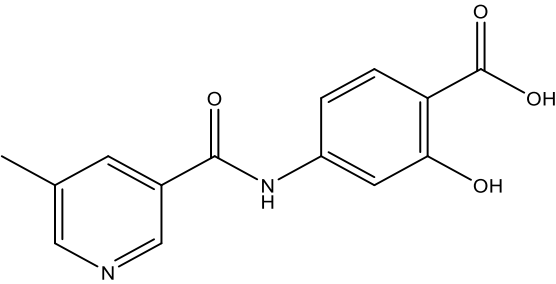
Kód látky	Vzorec a název	M _w	ClogP
GD10	 <p>N-(6-chloropyrazin-2-yl)pikolinamid</p>	234,64	1,07769

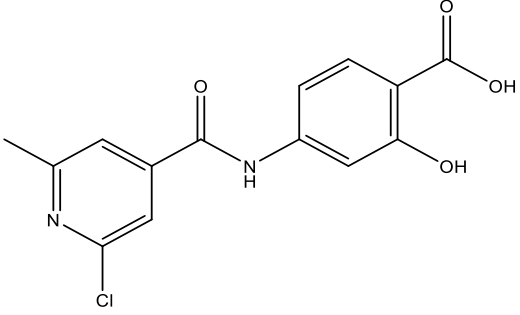
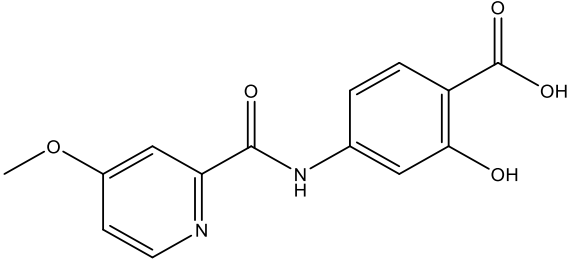
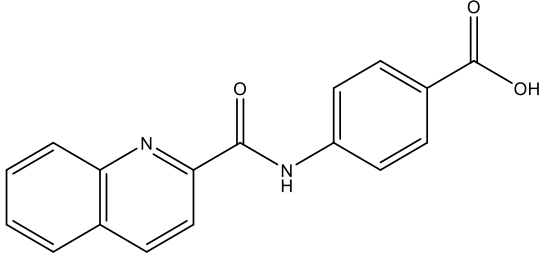
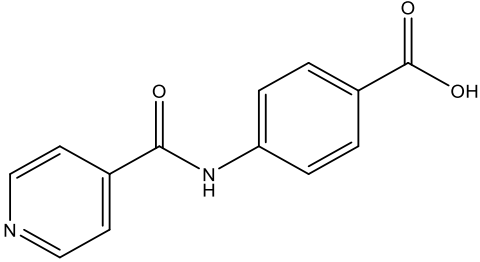
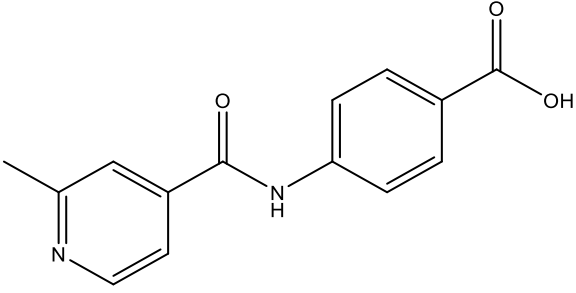
GD20	 <p><i>N</i>-(6-chloropyrazin-2-yl)-2-methylisonicotinamid</p>	248,67	1,22669
GD21	 <p>2,6-dichlor-<i>N</i>-(6-chloropyrazin-2-yl)isonicotinamid</p>	303,53	2,16968
GD23	 <p><i>N</i>-(6-chloropyrazin-2-yl)-5-methylnikotinamid</p>	248,67	1,22669
GD25	 <p><i>N</i>-(6-chloropyrazin-2-yl)isonicotinamid</p>	234,64	0,727691
GD34	 <p>2-chlor-6-methyl-<i>N</i>-(pyrazin-2-yl)isonicotinamid</p>	248,67	1,22164

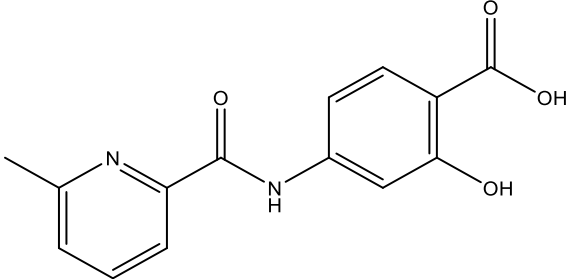
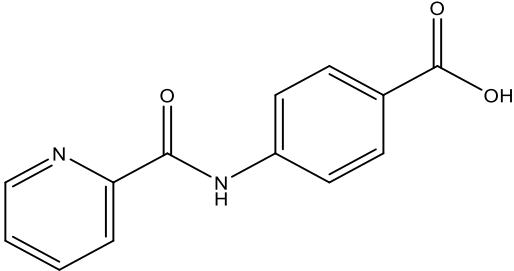
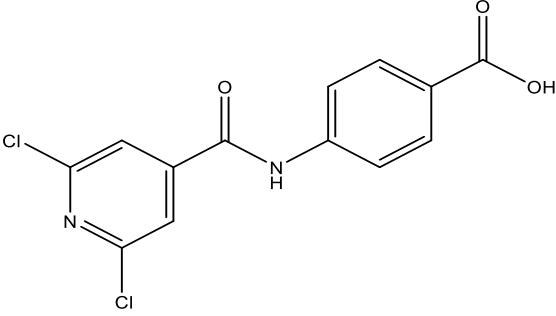
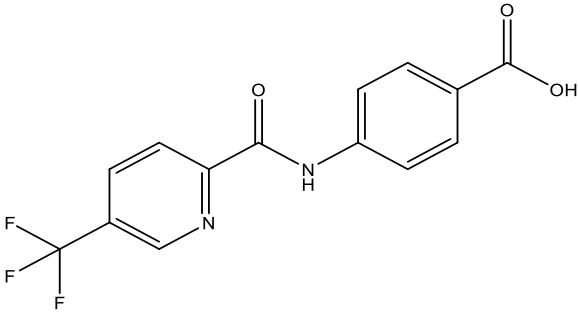
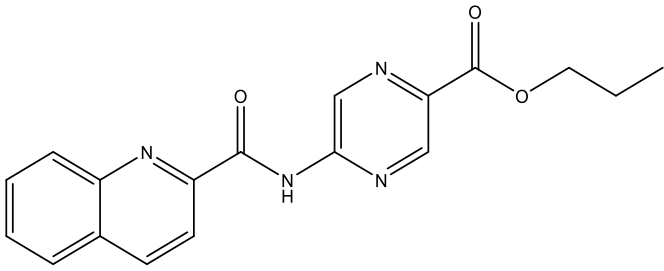
GD39	 <p><i>N</i>-(pyrazin-2-yl)-5-(trifluoromethyl)picolinamid</p>	268,2	1,22201
GD41	 <p>2-hydroxy-6-methyl-<i>N</i>-(pyrazin-2-yl)isonicotinamid</p>	230,23	0,829701
GD42	 <p>2-chlor-6-methyl-<i>N</i>-(pyrazin-2-yl)isonicotinamid</p>	248,67	1,22164
GD50	 <p><i>N</i>-(6-chloropyrazin-2-yl)-6-methylpicolinamid</p>	248,67	1,57669
GD63	 <p>3,5-dichlor-<i>N</i>-(pyrazin-2-yl)benzamid</p>	268,1	2,77314

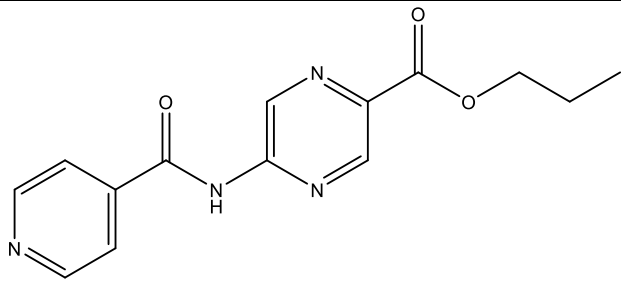
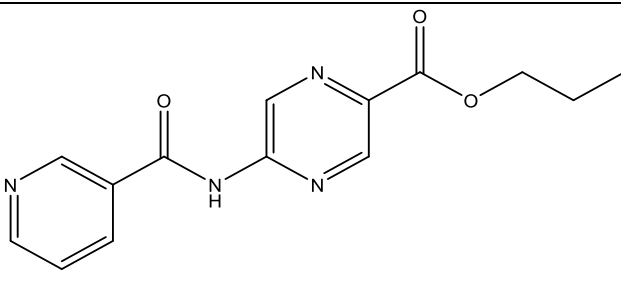
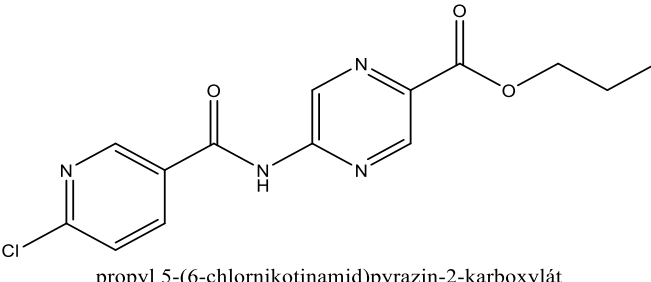
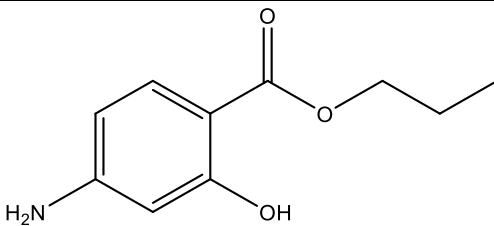
GD64	 <p>3-chlor-<i>N</i>-(pyrazin-2-yl)benzamid</p>	233,66	2,0515
GD65	 <p><i>N</i>-(pyrazin-2-yl)benzamid</p>	199,21	1,3138
GD66	 <p>4-chlor-<i>N</i>-(pyrazin-2-yl)benzamid</p>	233,66	2,0515

Tabulka 8 - 3. skupina látek (deriváty amidů kyseliny benzoové)

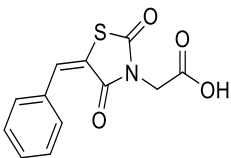
Kód látky	Vzorec a název	M_w	ClogP
GD33	 <p>2-hydroxy-4-(5-methylnikotinamid)benzoová kyselina</p>	272,36	2,47211

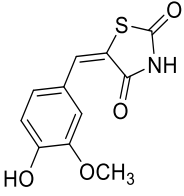
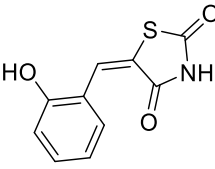
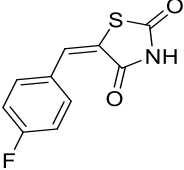
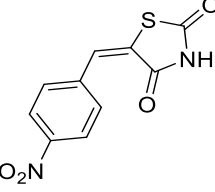
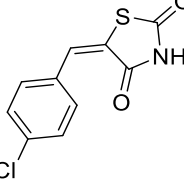
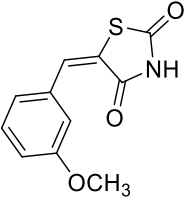
GD37	 <p>4-(2-chlor-6-methylisonikotinamid)-2-hydroxybenzoová kyselina</p>	306,7	3,21863
GD38	 <p>2-hydroxy-4-(4-methoxypikolinamid)benzoová kyselina</p>	288,26	2,70126
GD44	 <p>4-(chinolin-2-karboxamid)benzoová kyselina</p>	292,29	3,47704
GD45	 <p>4-(isonikotinamid)benzoová kyselina</p>	242,23	1,74304
GD48	 <p>4-(2-methylisonikotinamid)benzoová kyselina</p>	256,26	2,24204

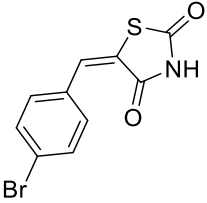
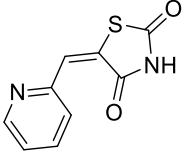
GD51	 <p>2-hydroxy-4-(6-methylpikolinamid)benzoová kyselina</p>	272,26	2,82211
GD53	 <p>4-(pikolinamid)benzoová kyselina</p>	242,23	2,09304
GD67A	 <p>4-(2,6-dichlorisonikotinamid)benzoová kyselina</p>	311,12	3,21429
GD68A	 <p>4-(5-(trifluormethyl)pikolinamid)benzoová kyselina</p>	310,23	3,01424
GDE1	 <p>propyl 5-(chinolin-2-karboxamid)pyrazin-2-karboxylát</p>	336,35	2,39418

GDE2	 <p>propyl 5-(isonikotinamid)pyrazin-2-karboxylát</p>	286,29	0,660182
GDE3	 <p>propyl 5-(nikotinamid)pyrazin-2-karboxylát</p>	286,29	0,660182
GDE4	 <p>propyl 5-(6-chlornikotinamid)pyrazin-2-karboxylát</p>	320,73	1,38503
GDSE	 <p>propyl 4-amino-2-hydroxybenzoát</p>	195,22	2,3186

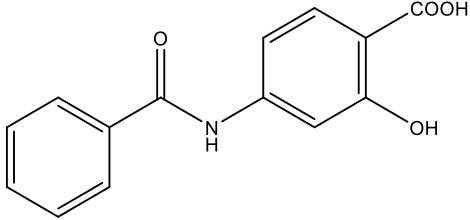
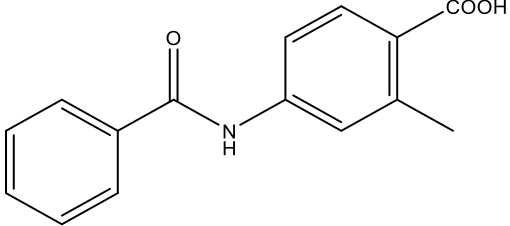
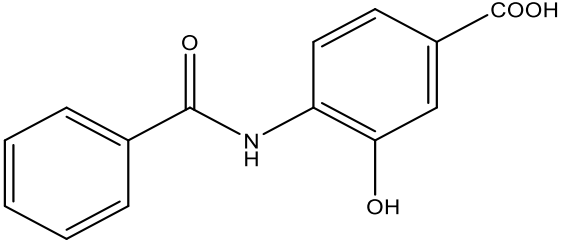
Tabulka 9 - 4. skupina látek (deriváty thiazolidin-2,4-dionů)

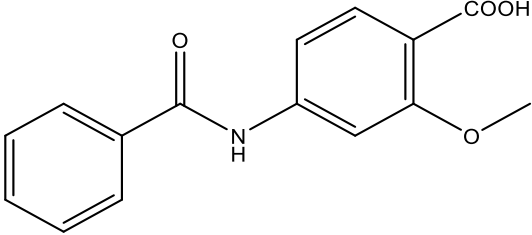
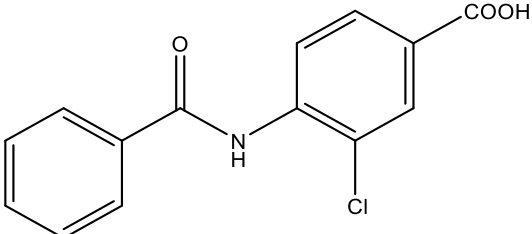
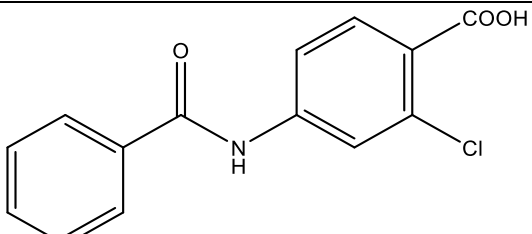
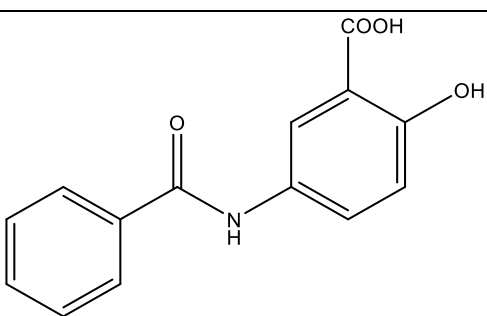
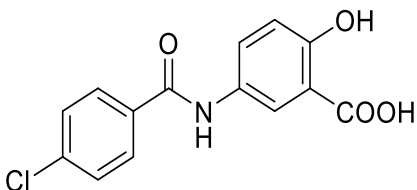
Kód látky	Vzorec a název	M _w	ClogP
Tab	 <p>(E)-2-(5-benzyliden-2,4-dioxothiazolidin-3-yl)octová kyselina</p>	263,27	2,041

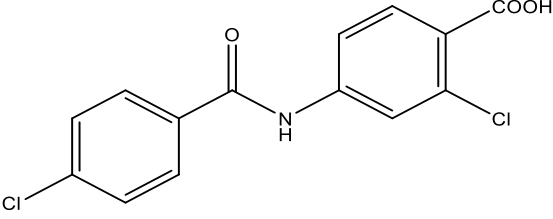
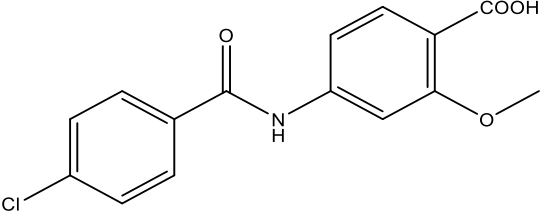
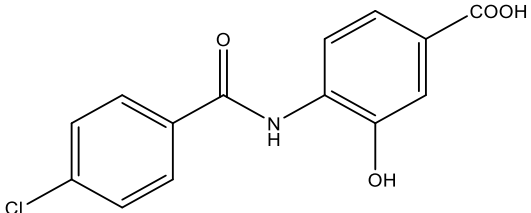
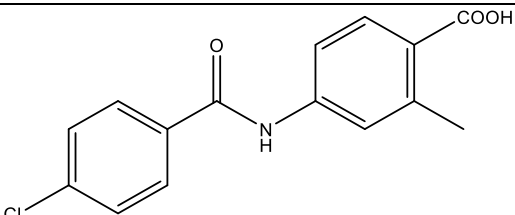
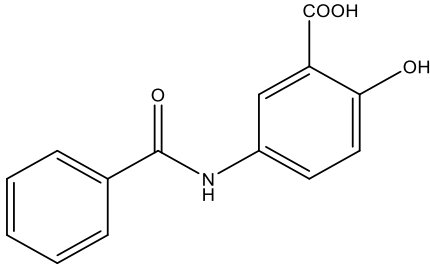
Ta	 <p>(E)-5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden)thiazolidin-2,4-dion</p>	251,26	0,8942
Tc	 <p>(E)-5-(2-hydroxybenzyliden)thiazolidin-2,4-dion</p>	221,23	1,045
Tcc	 <p>(E)-5-(4-fluorbenzyliden)thiazolidin-2,4-dion</p>	223,22	1,855
Ti (2)	 <p>(E)-5-(4-nitrobenzyliden)thiazolidin-2,4-dion</p>	250,23	1,455
Tm	 <p>(E)-5-(4-chlorbenzyliden)thiazolidin-2,4-dion</p>	239,67	2,425
Tp	 <p>(E)-5-(3-methoxybenzyliden)thiazolidin-2,4-dion</p>	235,26	1,631

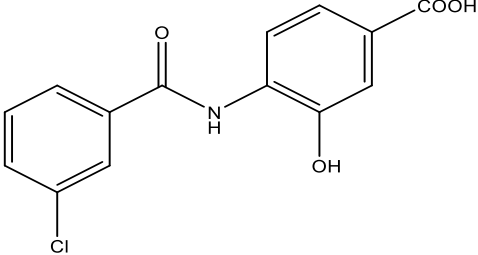
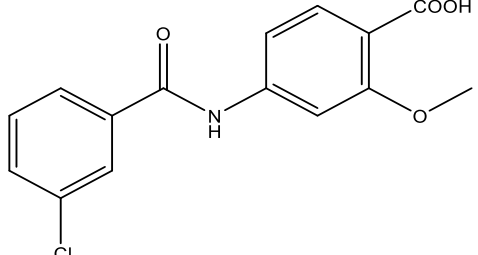
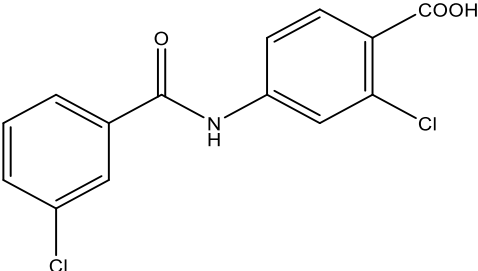
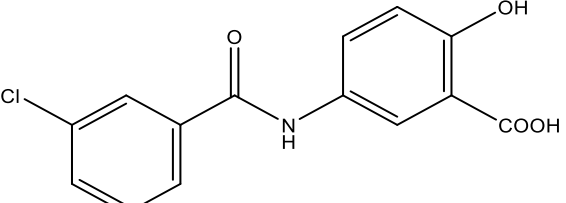
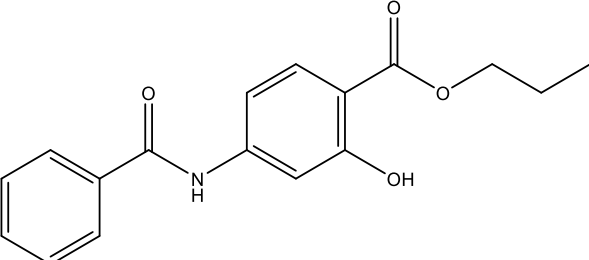
Tr	 <p>(E)-5-(4-brombenzyliden)thiazolidin-2,4-dion</p>	284,13	2,575
Tt	 <p>(E)-5-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-2,4-dion</p>	206,22	0,215

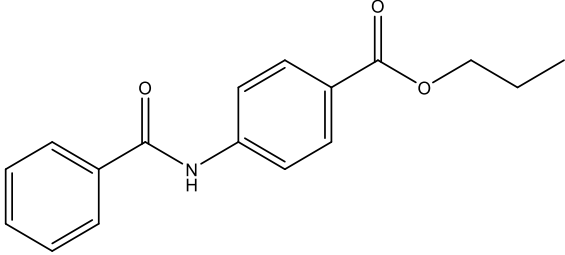
Tabulka 10 - 5. skupina látek (amidy bonzoové kyseliny a aminobenzoové kyseliny)

Kód látky	Vzorec a název	M _w	ClogP
WA_61	 <p>4-benzamid-2-hydroxybenzoová kyselina</p>	257,25	2,78352
WA_62	 <p>4-benzamid-2-methylbenzoová kyselina</p>	255,27	2,8864
WA_63	 <p>4-benzamid-3-hydroxybenzoová kyselina</p>	257,25	2,38352

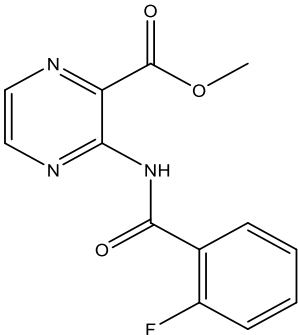
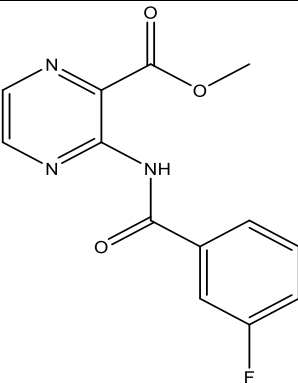
WA_64	 <p>4-benzamid-2-methoxybenzoová kyselina</p>	271,27	2,29699
WA_65	 <p>4-benzamid-3-chlorbenzoová kyselina</p>	275,69	2,66996
WA_66	 <p>4-benzamid-2-chlorbenzoová kyselina</p>	275,69	2,91966
WA_67	 <p>5-benzamid-2-hydroxybenzoová kyselina</p>	257,25	2,78352
WA_68	 <p>5-(4-chlorbenzamid)-2-hydroxybenzoová kyselina</p>	291,69	3,56708

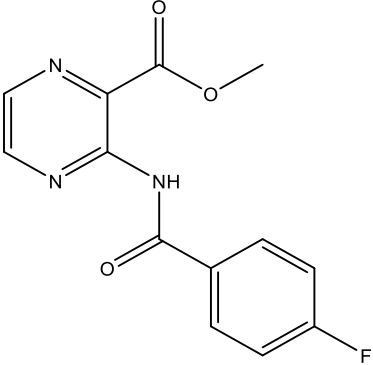
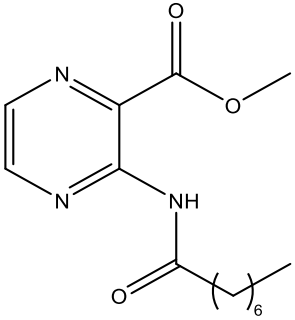
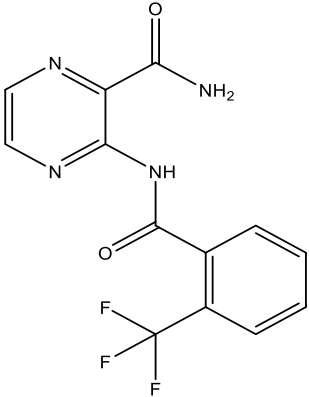
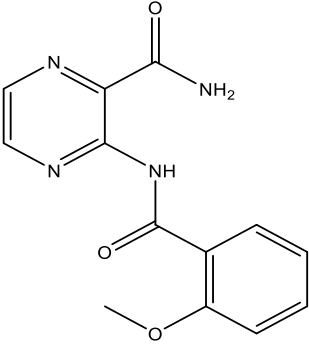
WA_69	 <p>2-chlor-4-(4-chlorbenzamid)benzoová kyselina</p>	310,13	3,65766
WA_70	 <p>4-(4-chlorbenzamid)-2-methoxybenzoová kyselina</p>	305,71	3,04497
WA_71	 <p>4-(4-chlorbenzamid)-3-hydroxybenzoová kyselina</p>	291,69	3,16708
WA_72	 <p>4-(4-chlorbenzamid)-2-methylbenzoová kyselina</p>	289,72	3,66996
WA_74	 <p>5-benzamid-2-hydroxybenzoová kyselina</p>	289,72	3,66996

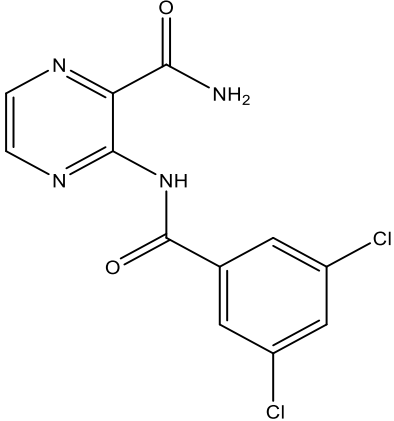
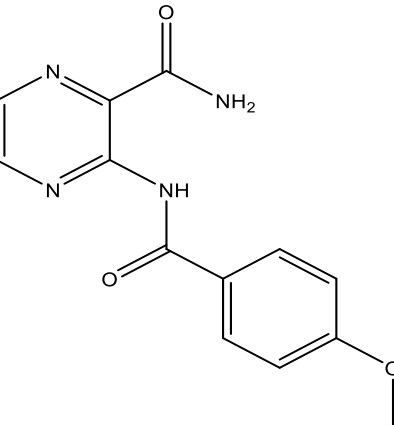
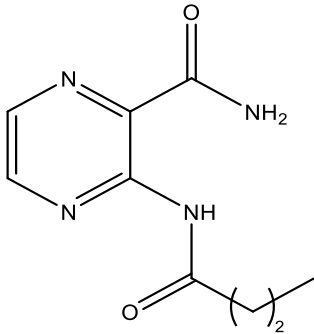
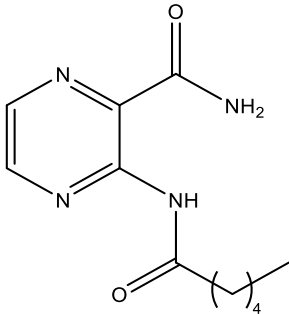
WA_75	 <p>4-(3-chlorobenzamid)-3-hydroxybenzoová kyselina</p>	291,69	3,16708
WA_76	 <p>4-(3-chlorobenzamid)-2-methoxybenzoová kyselina</p>	305,71	3,04497
WA_77	 <p>2-chlor-4-(3-chlorobenzamid)benzoová kyselina</p>	310,13	3,65766
WA_78	 <p>5-(3-chlorobenzamid)-2-hydroxybenzoová kyselina</p>	291,69	3,56708
WA_82	 <p>propyl 4-benzamid-2-hydroxybenzoát</p>	299,33	4,04136

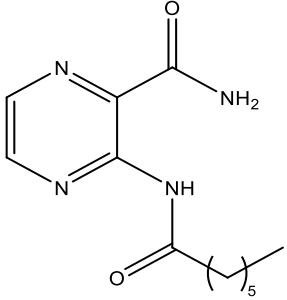
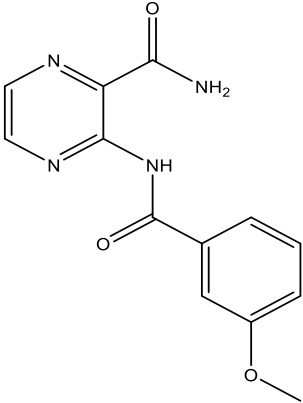
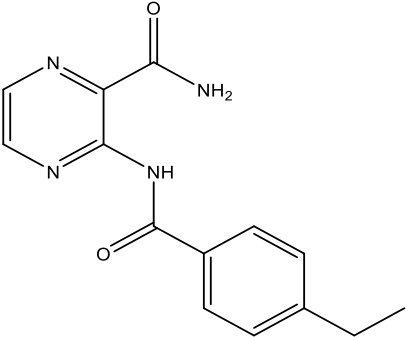
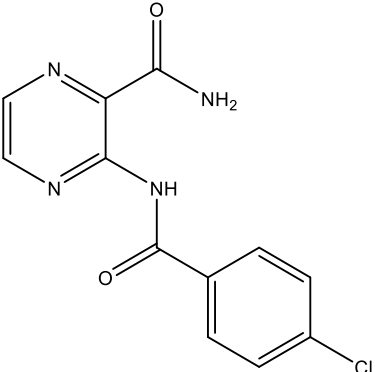
WA_83	 <p>propyl 4-benzamidbenzoát</p>	283,33	4,1462
-------	--	--------	--------

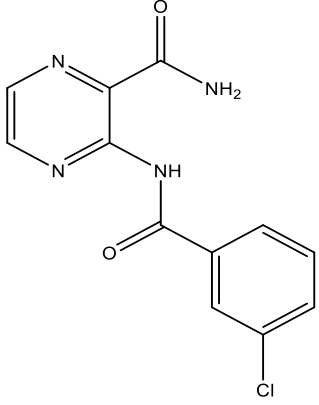
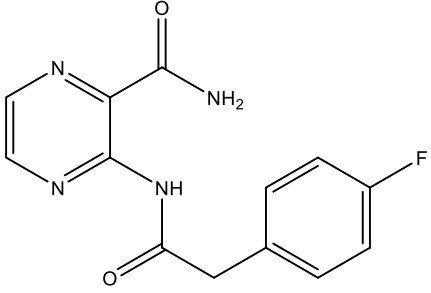
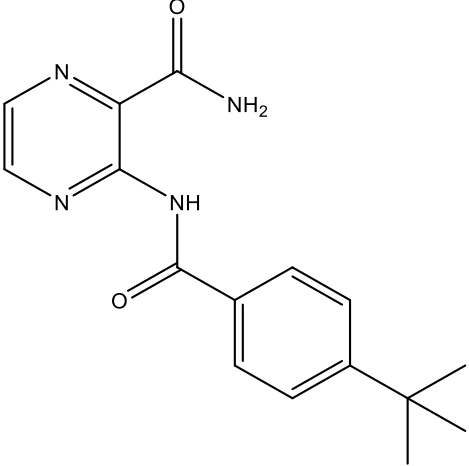
Tabulka 11 - 6. skupina látek (deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny)

Kód látky	Vzorec a název	M _w	ClogP
2 F-BCI	 <p>methyl 3-(2-fluorbenzamid)pyrazin-2-karboxylát</p>	275,24	0,702805
3 F-BCI	 <p>methyl 3-(3-fluorbenzamid)pyrazin-2-karboxylát</p>	275,24	1,1128

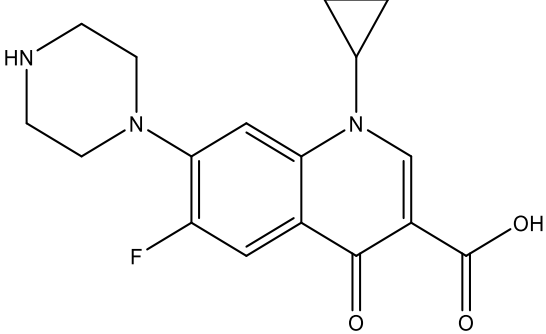
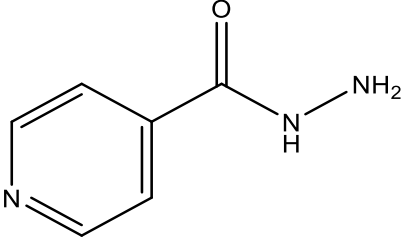
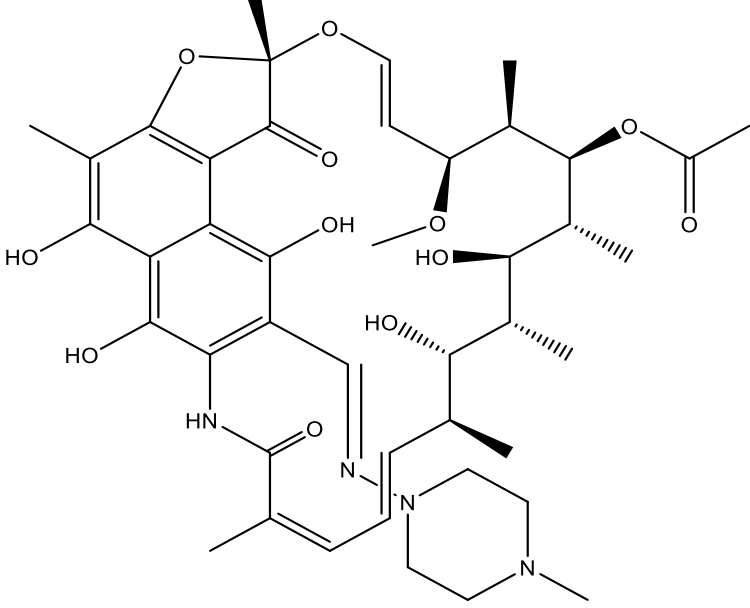
4 F-BCI	 <p>methyl 3-(4-fluorobenzamid)pyrazin-2-karboxylát</p>	275,24	1,1128
C7-BCI	 <p>methyl 3-oktanamidpyrazin-2-karboxylát</p>	279,34	2,64616
2CF3-NH3	 <p>3-(2-(trifluormethyl)benzamid)pyrazin-2-karboxamid</p>	310,24	0,647745
JZ-V1	 <p>3-(2-methoxybenzamid)pyrazin-2-karboxamid</p>	272,26	0,969216

JZ-V10A	 <p>3-(3,5-dichlorobenzamid)pyrazin-2-karboxamid</p>	311,12	2,39264
JZ-V12	 <p>3-(4-methoxybenzamid)pyrazin-2-karboxamid</p>	272,26	1,03922
JZ-V13	 <p>3-butyramidpyrazin-2-karboxamid</p>	208,22	0,523968
JZ-V15A	 <p>3-hexanamidpyrazin-2-karboxamid</p>	236,28	1,58197

JZ-V16	 <p>3-heptanamidpyrazin-2-karboxamid</p>	250,3	2,11097
JZ-V2	 <p>3-(3-methoxybenzamid)pyrazin-2-karboxamid</p>	272,26	1,03922
JZ-V3	 <p>3-(4-ethylbenzamid)pyrazin-2-karboxamid</p>	270,29	1,98297
JZ-V5	 <p>3-(4-chlorbenzamid)pyrazin-2-karboxamid</p>	276,68	1,67661

JZ-V6	 <p>3-(3-chlorobenzamid)pyrazin-2-karboxamid</p>	276,68	1,67661
JZ-V7	 <p>3-(2-(4-fluorfenyl)acetamid)pyrazin-2-karboxamid</p>	274,26	1,14697
JZ-V9	 <p>3-(4-(<i>tert</i>-butyl)benzamid)pyrazin-2-karboxamid</p>	298,35	2,78097

Tabulka 12 - Standardy antituberkulotik

Kód látky	Vzorec a název	M _w	ClogP
CIP	 <p style="text-align: center;">ciprofloxacin</p>	331,35	- 0,72524
INH	 <p style="text-align: center;">isoniazid</p>	137,14	-0,668
RIF	 <p style="text-align: center;">rifampicin</p>	822,95	3,71009

6.4 *Laboratorní vybavení*

6.4.1 **Přístroje**

- Centrifuga Hettich Rotanta 460R (Hettich, Tuttlingen, Německo)
- Laminární box ESCO (ESCO, Pensylvánie, USA)
- Analytické váhy Mettler (Mettler-Toledo, Ohio, USA)
- Termostat Binder (Binder, Tuttlingen, Německo)
- Vortex IKA (IKA, Staufen, Německo)
- Denzitometr Biosan (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- multidetekční reader Synergy HTX (BioTek, Winooski, USA)

6.4.2 **Pomůcky**

- Laboratorní špičky Eppendorf (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Mikropipety Eppendorf (20-200 μ l, 100-1000 μ l) (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Multikanálová pipeta Eppendorf (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- PP zkumavky GAMA (Gamedium, Jesenice, Česká republika)
- Mikrozksamavky 1,5ml Eppendorf (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Stojánek na zkumavky a mikrozksamavky (Brandt, Wertheim, Německo)
- Mikrotitrační destičky s víčky GAMA (Gamedium, Jesenice, Česká republika)
- Fólie na destičky (VWR International, Radnor, USA)
- Korýtka (Brandt, Wertheim, Německo)

6.4.3 **Chemikálie**

- Sterilní voda (Ardeapharma a.s., Ševětín, Česká republika)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
- Bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
- OADC suplement (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombaj, Indie)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
- Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
- Rifampicin (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
- Isoniazid (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
- Sodná sůl resazurinu (Acros Organics, Geel, Belgie)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)

6.5 Postup testování

6.5.1 Příprava látek

Chemické látky dodané z katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy s uvedenou navážkou a standardy se rozpustí ve vypočítaném množství DMSO dle vztahu:

$$\text{navážka} \times 50 = ? \mu\text{l DMSO}$$

Vzniklý roztok se promíchá na vortexu do úplného rozpuštění nebo do vytvoření homogenní suspenze. V případě, že se chemická látka nerozpouští, naředíme ji ještě jednou stejným objemem DMSO. V případě, že stále nedochází k úplnému rozpuštění, přidají se ještě dva ekvivalenty DMSO. V případě přidání většího množství DMSO bude výsledná koncentrace léčivé látky buď o polovinu nebo čtyřnásobně nižší.

6.5.2 Příprava roztoků v bujónu

Z takto připravených roztoků se odebere určité množství a doředí se bujónem na požadovanou koncentraci. V případě standardů ciprofloxacinu a rifampicinu se používá větší ředění z důvodů nižší MIC. Všechny vzniklé roztoky je třeba důkladně promíchat na vortexu.

M. aurum a *M. smegmatis*:

- o RIF – 25 μl naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu
- o CIP – 20 μl naředěného roztoku + 980 μl DMSO →
25 μl 2. naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu
- o INH – 50 μl naředěného roztoku + 450 μl bujónu
- o testované látky - 50 μl naředěného roztoku + 450 μl bujónu

M. tbc H37Ra

- o RIF – 50 μl naředěného roztoku + 450 μl DMSO →
20 μl 2. naředěného roztoku + 980 μl DMSO →
25 μl 3. naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu

- o CIP – 20 µl naředěného roztoku + 980 µl DMSO →
25 µl 2. naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu
- o INH - 20 µl naředěného roztoku + 980 µl DMSO →
25 µl 2. naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu
- o testované látky - 50 µl naředěného roztoku + 450 µl bujónu

6.5.3 Příprava destičky

Destičku je třeba před začátkem pipetování pečlivě popsat typem testovaných látek (kód), pozitivní a negativní kontrolou a kmenem, který bude na destičku použit. Do obvodových jamek destičky je třeba napipetovat 250 µl sterilní H₂O. Tímto krokem se zamezí vysychání jednotlivých jamek v průběhu inkubace. Do sloupců 2 až 9 a 11 je třeba napipetovat 100 µl bujónu. Do sloupce 10, který slouží jako negativní kontrola, je třeba napipetovat 200 µl bujónu.

6.5.4 Pipetování látek

Připravené naředěné testované látky a standardy jsou napipetovány do druhého sloupce na destičce v objemu 100 µl. Dané látky se pipetují v duplikátu. Na jedné destičce je tedy možné testovat celkem tři látky.

Takto napipetované látky se poté pomocí dvojkového ředění rozpipetují po celé destičce. Napipetované látky se promíchají pomocí pipety s bujónem již připraveným v destičce. Odebere se 100 µl promíchané látky s bujónem a dojde k přenosu do třetího sloupce, obsah je opět pomocí pipety promíchán a 100 µl je přeneseno do dalšího sloupce. Stejný postup se opakuje až do sloupce 9. Z 9 sloupce je po promíchání 100 µl odebráno a vyhozeno do odpadu.

6.5.5 Příprava mykobakteriální suspenze

Suspenze je vytvořena z inokula příslušného mykobakteriálního kmene v bujónu. Po inkubaci při 37 °C je suspenze je stočena na centrifuze a následně opětovně resuspendována v cca 4 ml čerstvého bujónu. Po resuspendaci je změřena optická denzita

na denzitometru. Požadovaná hodnota je 1.0 McFarlanda, v případě potřeby je nutno suspenzi naředit.

Pracovní suspenze je připravena naředěním bujónem Middlebrook 7H9 v poměru 1:20 (výsledně 42 ml) pro *M. aurum* a *M. smegmatis*, pro *M. tbc* H37Ra je pracovní suspenze připravena naředěním v poměru 1:10 (výsledně 33 ml). Pracovní suspenze je po 100 µl rozpipetována do každé jamky mikrotitrační destičky. Vynechá se jen sloupec 10, kde se nachází negativní kontrola. Schéma mikrotitrační destičky viz obrázek 21.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
B	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
C	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
D	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
E	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
F	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
G	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Obrázek 21 - Schéma mikrotitrační destičky.

H₂O – sterilní voda, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola, jamky 2-9 - testované látky v koncentracích od 500 µg/ml do 3,91 µg/ml.

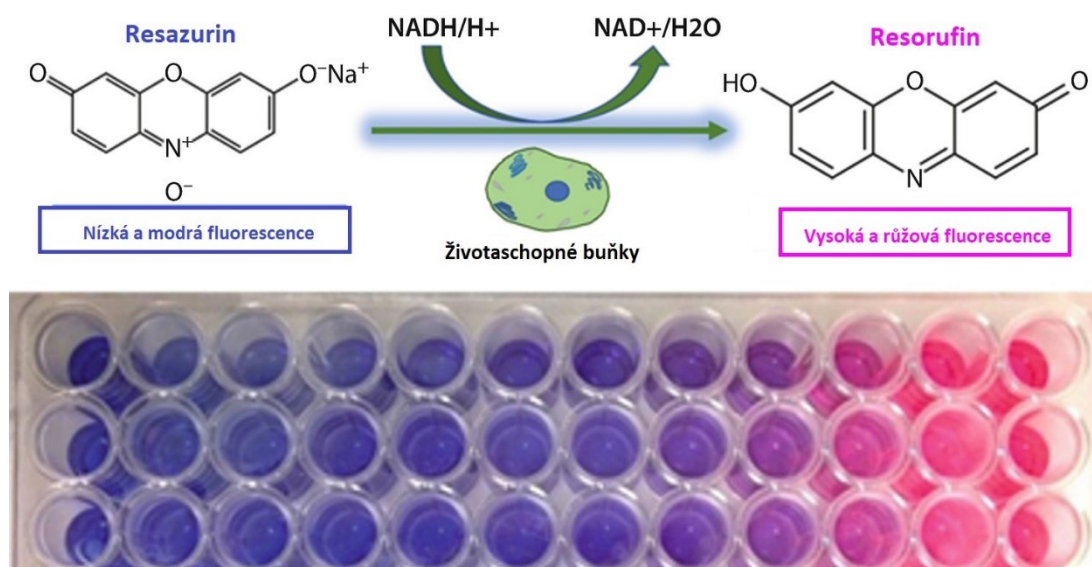
6.5.6 Inkubace

Jednotlivé destičky se zalepí průhlednou fólií a nechají se inkubovat v termostatu. *Mycobacterium smegmatis* se inkubuje při 37 °C po dobu 2 dnů, *Mycobacterium aurum* se inkubuje při 37 °C po dobu 3 dnů a *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra při 37 °C po dobu 5 dnů.

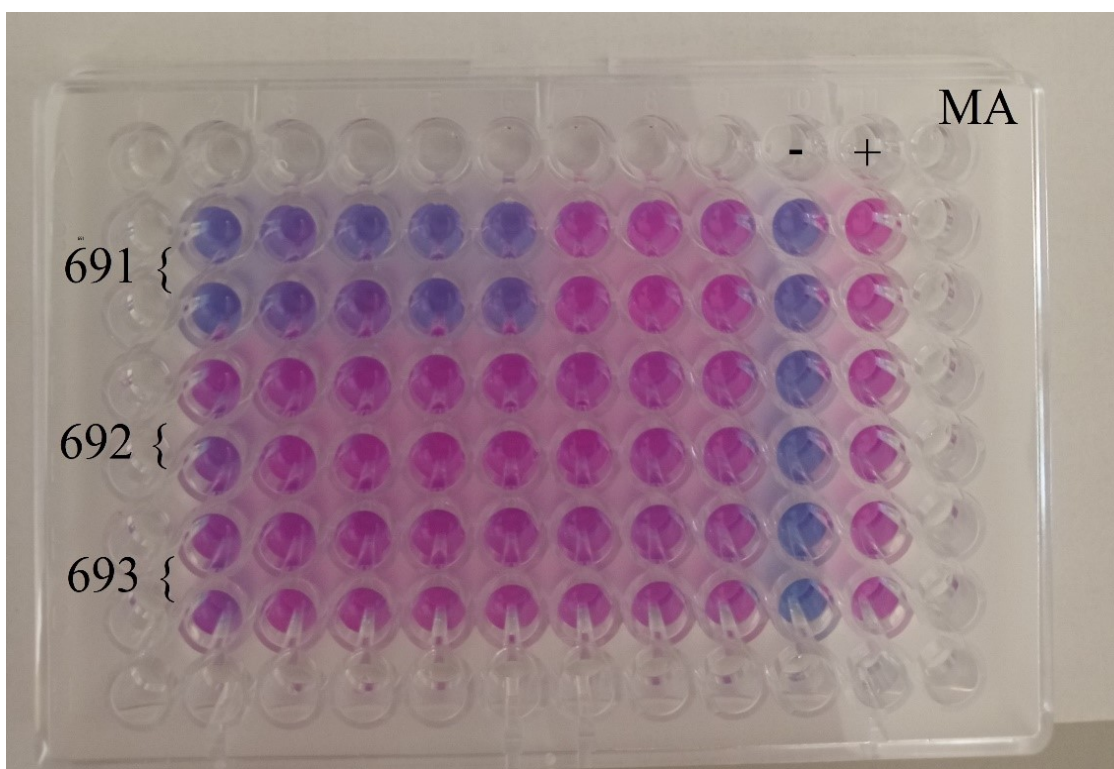
6.5.7 Hodnocení

Po dvoudenní inkubaci *M. smegmatis* se zkoumanými léčivými látkami je do jednotlivých jamek přidáno 20 µl 0,1% roztoku sodné soli resazurinu. Po 2,5 až 3 hodinách dojde k odečtu. U *M. aurum* se odečet provádí po třídenní inkubaci a stejně jako u předchozí mykobakterie i zde se do jednotlivých jamek přidá 20 µl indikátoru. Po pětidenní inkubaci se provádí odečet u *M. tuberculosis* H37Ra. Do jednotlivých jamek se přidá 20 µl 0,1% roztoku sodné soli resazurinu a odečet je proveden po 18 hodinách. Jako hodnota MIC je považována první jamka, kde dojde ke změně modré barvy na růžovofialovou.

Sodná sůl resazurinu (obchodní název Alamar Blue[®]) je činidlo, které se využívá k detekci životaschopnosti buněk. Obsahuje v sobě netoxické a slabě fluorescenční modré barvivo zvané resazurin. Vizualizace pomocí resazurinu závisí na aktivitě buněčných dehydrogenáz v přítomnosti NADH/NADPH. V buňkách, které jsou metabolicky aktivní a podstupují aerobní dýchání, je resazurin nevratně redukován na resorufin. Tento jev je pozorovatelný změnou barvy, kdy se z modré stává růžová a vydává silnou fluorescenci (viz obr. 22). Detekce je prováděna spektrofotometricky s měřením buď fluorescence v excitačním (530-560 nm) a emisním spektru (590 nm), nebo lze měřit absorbanci (570 nm a 600 nm) (Bio-Rad, 2021; Biocompare, 2021)



Obrázek 22 - Nahoře: Přeměna nefluorescenčního modrého resazurinu na růžový fluorescenční resorufin. Dole: Mikrotitrační destička ukazující konverzi modrého resazurinu na růžový resorufin (buňky postupně ztrácejí svou životaschopnost zprava doleva). (Sarvazyan, 2020)



**Obrázek 23 - Ukázka testování pro látky s antimykobakteriálním účinkem.
Mikrotitrační destička inkubována s *Mycobacterium aurum*.
(Zdroj: autor práce)**

6.6 Výsledky

Výsledky testování jsou shrnuty v tabulkách 13–19. Jednotlivé tabulky jsou řazeny podle skupin léčiv a poslední tabulka s hodnotami standardů. Celkem bylo testováno 88 látek. V tabulkách jsou uvedeny jednotlivé hodnoty MIC pro daný kmen mykobakterie po účinku zkoumané léčivé látky. Pakliže je v tabulkách uveden symbol \geq , znamená to, že daná látka nemá ani ve své nejvyšší koncentraci antimykobakteriální účinek. V případě, že se látka nedala rozpustit, bylo třeba ji ještě naředit v DMSO. V takovém případě je pod danou sloučeninou uvedené zředění.

Tabulka 13 - Výsledky testování 1. skupiny látek

Označení	A	B	C	D	E	F
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 250	≥ 500	250	≥ 500	250	125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 250	≥ 500	250	≥ 500	250	62.5
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	≥ 250	250	250	250	≥ 500	125
pozn.	nařed. 2x					
Označení	G	H	I	J	K	L
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 125	250	≥ 500	≥ 500	250	≥ 125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 125	125	≥ 500	≥ 500	250	≥ 125
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	≥ 125	125	250	250	250	≥ 125
pozn.	nařed. 4x					nařed. 4x
Označení	M	N				
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 125				
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	62.5				
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	≥ 500	62.5				
pozn.		nařed. 4x				

Výsledky testování první skupiny látek jsou uvedeny v tabulce č. 13. Látky s kódem A, G, L a M neprokázaly žádný antimykobakteriální účinek. Látky C a K měly částečnou účinnost na všechny tři kmeny. U látek B, D, I a J byla prokázána částečná účinnost na některý ze tří kmenů. U látky E se prokázala částečná účinnost na *M. smegmatis* a *M. aurum*, ale žádná antimikrobiální účinnost na *M. tbc* H37Ra. Látka H měla částečnou účinnost u všech tří kmenů. Látka F vykazovala částečnou antimykobakteriální účinnost. Účinek byl nejlepší proti *M. aurum* s hodnotou MIC 62,5 µg/ml, proti *M. smegmatis* a *M. tbc* H37Ra byla hodnota MIC shodná, 125 µg/ml. Látka N, kterou bylo třeba kvůli horší rozpustnosti naředit čtyřnásobně, měla antimykobakteriální účinnost proti *M. aurum* a *M. tbc* H37Ra.

Sloučeniny G, L a N byly velmi špatně rozpustné a bylo je třeba naředit čtyřnásobně. Sloučeninu A bylo třeba kvůli horší rozpustnosti třeba naředit dvojnásobně.

Tabulka 14 - Výsledky testování 2. skupiny látek

Označení	GD10	GD20	GD21	GD23	GD25	GD34
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 500	250
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	250	≥ 500	≥ 250	≥ 500	62.5
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	250	≥ 500	250	≥ 250	≥ 500	31.25
pozn.				nařed. 2x		
Označení	GD39	GD41	GD42	GD50	GD63	GD64
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 125	250
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 125	250
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 125	62.5
pozn.					nařed. 4x	
Označení	GD65	GD66				
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 250				
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 250				
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	≥ 500	62.5				
pozn.		nařed. 2x				

V druhé skupině se jako látka s antimykobakteriální účinky jeví GD34 a GD64. Látka GD34 se v případě *M. aurum* a *M. tbc* H37Ra jeví jako účinnější oproti látce GD64. Látka GD64 má nižší účinnost u *M. smegmatis* a *M. aurum*. U *M. tbc* H37Ra se ukázaly jako shodně antimykobakteriální účinné GD64 a GD66. Látka GD66 po dvojitém zředění vykazovala antimykobakteriální účinnost vůči *M. tbc* H37Ra a žádnou účinnost na zbývající dva kmeny. Sloučeniny GD10, GD20 a GD21 jeví nízkou účinnost proti alespoň jednomu z testovacích kmenů. Zbývající látky neprokázaly žádné antimikrobiální účinky.

Látka GD23, GD63 a GD66 byly špatně rozpustné, a proto bylo třeba je více naředit.

Tabulka 15 - Výsledky testování 3. skupiny látek

Označení	GD33	GD37	GD38	GD44	GD45	GD48
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	125	250	≥ 125	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	62.5	62.5	≥ 125	≥ 500
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	≥ 500	250	31.25	15.625	≥ 125	≥ 500
pozn.					nařed. 4x	
Označení	GD51	GD53	GD67A	GD68A	GDE1	GDE2
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	250	≥ 125	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	250	≥ 500	250	≥ 125	≥ 500
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	250	125	250	250	≥ 500	250
pozn.					nařed. 4x	
Označení	GDE3	GDE4	GDSE			
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500			
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	500	≥ 500	≥ 500			
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	250	500	250			
pozn.						

V tabulce č. 15 jsou shrnuty výsledky testování třetí skupiny látek. Antimykobakteriální účinnost vykazují látky GD38 a GD44. V případě *M. aurum* je jejich účinnost stejná. U *M. tbc* H37Ra se jeví jako účinnější GD44 (MIC 15,625 µg/ml) oproti GD38 (MIC 31,25 µg/ml). Látka GD68A měla částečnou účinnost v případě všech tří kmenů. Látky GD37, GD51, GD53, GD67A, GDE2, GDE3, GDE4 a GDSE měly částečnou účinnost alespoň u jednoho ze zkoumaných kmenů. Zbylé látky nevykazovaly žádnou nebo jen částečnou antimikrobiální účinnost u alespoň u jednoho kmene.

Látku GD45 a GDE1 bylo třeba kvůli potížím s rozpustností více naředit.

Tabulka 16 - Výsledky testování 4. skupiny látek

Označení	Ta	TAb	Tc	Tcc	Ti(2)	Tm
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	125	≥ 500	31.25	62.5	125	250
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	62.5	250	15.625	31.25	62.5	31.25
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	31.25	125	31.25	15.625	15.625	31.25
pozn.						
Označení	Tp	Tr	Tt			
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	250	250	125			
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	31.25	31.25	125			
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	15.625	15.625	62.5			
pozn.						

Ze čtvrté skupiny látek má nejnižší antimykobakteriální účinek sloučenina TAb. Ta vykazuje u všech tří kmenů nulovou nebo částečnou účinnost. Látka Tt vykazuje částečnou účinnost v případě *M. smegmatis* a *M. aurum* (MIC 125 µg/ml). V případě *M. tbc* H37Ra byla účinnost o něco vyšší (MIC 62,5 µg/ml). Látky Ta a Ti(2) vykazují stejnou účinnost v případě *M. smegmatis* a *M. aurum*. Pokud se u těchto dvou látek jedná o *M. tbc* H37R3a je Ti(2) dvakrát účinnější než látka Ta.

Látky Tcc, Tm, Tp a Tr vykazovaly stejnou účinnost u *M. aurum* s hodnotou MIC 31,25 µg/ml. Látky Tp a Tr se krom hodnot u *M. aurum* shodují ve svém antimykobakteriální účinku i u zbylých dvou mykobakterií. U *M. smegmatis* vykazovaly částečnou účinnost a u *M. tbc* H37Ra byla účinnost o něco vyšší (MIC 15,625 µg/ml). Látka Tcc má v případě *M. smegmatis* vyšší účinnost než látky předchozí a v případě *M. tbc* H37Ra je účinnost totožná. Látka Tm se od látek Tp a Tr liší pouze v hodnotě u *M. tbc* H37Ra, kde je její účinnost nižší. Látka Tc vykazuje antimykobakteriální účinnost v případě všech tří zkoumaných kmenů.

Tabulka 17 - Výsledky testování 5. skupiny látek

Označení	WA_61	WA_62	WA_63	WA_64	WA_65	WA_66
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	500	≥ 500	250	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	250	250	250	250	250	≥ 500
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	62.5	250	125	250	125	250
pozn.						
Označení	WA_67	WA_68	WA_69	WA_70	WA_71	WA_72
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	250	125	250	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	125	125	250
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	250	125	125	125
pozn.						
Označení	WA_74	WA_75	WA_76	WA_77	WA_78	WA_82
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	250	250	250	250	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	250	250	250	250	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	125	125	125	125	≥ 500	≥ 500
pozn.						
Označení	WA_83					
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	31.25					
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500					
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	≥ 500					
pozn.						

V tabulce č. 17 jsou uvedeny výsledky měření páté skupiny látek. Látky WA_66, WA_67, WA_68, WA_78 a WA_82 nevykazovaly žádnou či v případě WA_66 částečnou antimikrobiální účinnost. Látka WA_61 vykazovala vyšší antimykobakteriální účinnost v případě *M. tbc* H37Ra a o něco nižší u *M. aurum*. Oproti tomu u látky WA_83 byla nejvíce pozorovaná účinnost u *M. smegmatis* (MIC 31,25 µg/ml), u zbylých dvou mykobakterií nebyl účinek žádný. Látky WA_64, WA_70, WA_71, WA_74, WA_75, WA_76, WA_77 vykazovaly částečnou antimykobakteriální účinnost u všech tří mykobakterií. Zbývající látky byly částečně účinné u dvou ze tří mykobakterií.

Tabulka 18 - Výsledky testování 6. skupiny látek

Označení	2F-BC1	3F-BC1	4F-BC1	C7-BC1	2CF3-NH3	JZ-V1
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	250	≥ 500	62.5
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	125	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	250	250	≥ 500	250	500	125
pozn.						
Označení	JZ-V10A	JZ-V12	JZ-V13	JZ-V15A	JZ-V16	JZ-V2
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 62.5	≥ 125	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 250
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 62.5	≥ 125	≥ 500	250	≥ 500	≥ 250
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	≥ 62.5	≥ 125	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 250
pozn.	nařed. 8x	nařed. 4x + sus	nařed. 4x + sus			nařed. 2x
Označení	JZ-V3	JZ-V5	JZ-V6	JZ-V7	JZ-V9	2CF3-NH3
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	3.91	≥ 125	≥ 250	15.625	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 250	≥ 125	≥ 250	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	≥ 500	3.91	≥ 125	≥ 250	15.625	500
pozn.		nařed. 2x	nařed. 4x + sus	nařed. 2x	nařed. 4x + sus	

V tabulce č. 18 jsou uvedeny výsledky testování šesté skupiny látek. Látka JZ-V5 vykazovala po dvojitěm ředění vyšší antimykobakteriální účinnost u dvou ze tří kmenů (*M. smegmatis* a *M. tbc* H37Ra). Látka JZ-V9 byla po čtyřnásobném naředění v případě *M. smegmatis* a *M. tbc* H37Ra účinná. V případě *M. aurum* nebyla u JZ-V9 pozorována žádná účinnost. Další sloučenina s antimykobakteriální účinností je JZ-V1. Účinnost byla vyšší v případě *M. smegmatis* a u *M. tbc* H37Ra byla účinnost nižší. V případě *M. aurum* nebyla pozorována účinnost. U sloučeniny C7-BC1 byla pozorována nižší účinnost u všech tří mykobakterií. Zbylé sloučeniny vykazovaly částečnou nebo žádnou účinnost.

Sloučenina JZ-V10A byla naředěná osmkrát. JZ-V12, JZ-V13, JZ-V6 a JZ-V9 byla naředěná čtyřikrát, a i přes ředění zůstala v roztoku suspenze zkoumané látky. U látek JZ-V2, JZ-V5 a JZ-V7 bylo provedeno dvojitě ředění.

Tabulka 19 - Výsledky testování standardů

Označení	INH	RFM	CPX	INH	RFM	CPX
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	15.625	3.125	0.0625	15.625	3.125	0.125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	3.91	0.39	0.015625	3.91	0.39	0.015625
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	0.25	0.003125	0.25	0.25	0.003125	0.25
Označení	INH	RFM	CPX	INH	RFM	CPX
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	15.625	1.56	0.0625	15.625	3.125	0.125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	3.91	0.39	0.015625	3.91	0.78	0.03125
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	0.25	0.0015625	0.25	0.25	0.003125	0.25
Označení	INH	RFM	CPX	INH	RFM	CPX
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	15.625	3.125	0.0625	15.625	3.125	0.0625
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	3.91	0.39	0.015625	3.91	0.39	0.015625
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	0.25	0.003125	0.25	0.25	0.003125	0.25
Označení	INH	RFM	CPX	INH	RFM	CPX
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	15.625	1.56	0.0625	15.625	1.56	0.125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	3.91	0.39	0.015625	3.91	0.78	0.03125
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	0.25	0.003125	0.25	0.25	0.003125	0.25
Označení	INH	RFM	CPX	INH	RFM	CPX
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	15.625	3.125	0.0625	15.625	3.125	0.125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	3.91	0.39	0.015625	3.91	0.78	0.03125
MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/mL)	0.25	0.003125	0.25	0.25	0.003125	0.25

V tabulce č. 19 jsou uvedeny výsledky měření všech standardů, které byly testovány v každé sérii. Standardy slouží jak ke kontrole správnosti testování, tak i k porovnání účinnosti stanovovaných látek a těchto standardů. Na základě stejných výsledků v jednotlivých sériích, případně rozdílu o jednu jamku (což je v rámci tolerance), lze konstatovat, že systém byl stabilní a výsledky jsou tím pádem validní.

7. DISKUSE

Atypické, netuberkulózní mykobakterie jsou často opomíjenými původci mnoha onemocnění. Ačkoliv nebývají hrozbou pro lidi se zdravou imunitou, může se stát, že nákaza i tak propukne. Lidé se v dnešní době dožívají vyššího věku a s tím je spojený i vyšší výskyt onemocnění, která dříve měla mnohem nižší incidenci jako například rakovina a s tím spojená imunodeficience. Krom této podoby narušení imunity je tu stále HIV, imunodeficience získaná po některých lécích, po operacích jako je například splenektomie, při nefrotickém syndromu a spoustě dalších. Nákaza netuberkulózními mykobakteriemi může postihnout kohokoliv, ačkoliv je tam riziko malé.

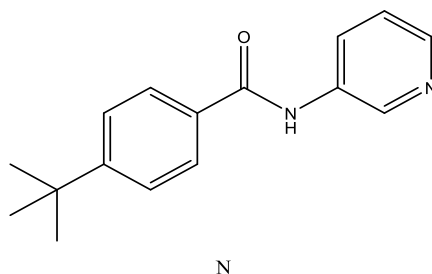
Výskyt NTM ve většině zemích nespadá mezi onemocnění, která je potřeba hlásit. Oproti tomu u tuberkulózy je povinnost výskyt hlásit, je bedlivě monitorovaná, vychází pravidelné informace o jejím výskytu, počtu nakažených, počtu zemřelých atd. Zároveň je na snížení incidence nastavený několikaletý plán. Výjimkou je *M. ulcerans* způsobující vřed Buruli, které spadá pod povinné hlášení WHO.

Stejně jako u *M. tuberculosis* se u netuberkulózních mykobakterií stále častěji objevují rezistentní kmeny na klasicky podávaná antituberkulotika. Kmeny se stávají nebezpečnějšími a agresivnějšími a dopad je samozřejmě patrný i na pacientech, kteří musí brát léky po mnohem delší dobu. Proto se stále hledají nové alternativy léčby a nová léčiva, která by mohla dobu léčby zkrátit.

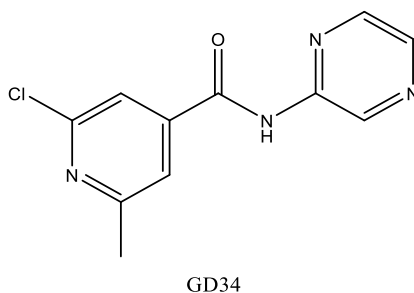
V experimentální části diplomové práce bylo pomocí mikrodiluční bujónové metody otestováno 88 potenciálně antimykobakteriálně účinných látek. Testované látky byly dodány z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy (Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy). Testování citlivosti bylo prováděno na třech kmenech mykobakterií – *M. smegmatis*, *M. aurum* a *M. tuberculosis* H37Ra. Tyto kmeny byly vybrány kvůli nízké patogenitě, kterou disponují a první dva jmenované i z důvodu rychlého růstu.

Ze všech testovaných sloučenin prokázalo antimikrobiální účinnost 20 látek. Horní hranice pro určení efektivní antimikrobiální účinnosti byla hodnota MIC 62,5 µg/ml. Bez jakéhokoliv účinku bylo 29 látek. Zbývající látky měly v porovnání se standardy antimikrobiální účinek mnohonásobně slabší.

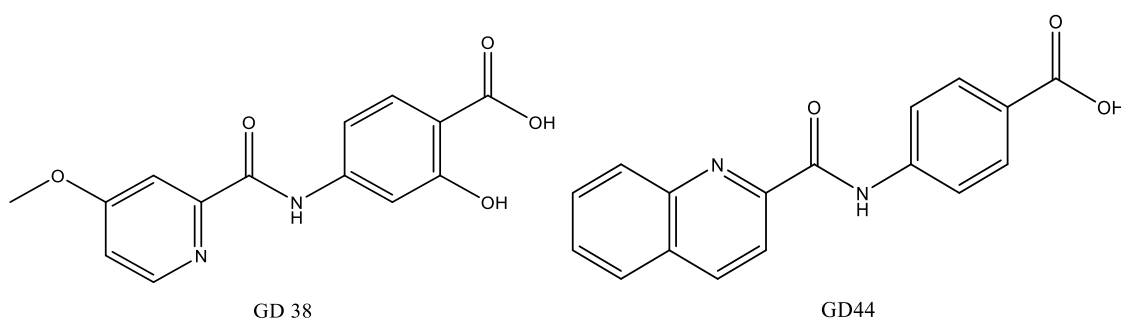
První skupina obsahovala celkem čtrnáct látek, jejichž součástí je pyridinový heterocyklus. V rámci této skupiny vykazovaly antimikrobiální účinnost pouze látky F (*N*-(6-chlorpyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid) a N (*N*-(pyridin-3-yl)-4-(*tert*-butyl)benzamid). Látka F byla slabě účinná proti *M. smegmatis* a *M. tbc* H37Ra s hodnotou 125 µg/ml. Vyšší účinnost vykazovala proti *M. aurum*, kde byla naměřena hodnota MIC 62,5 µg/ml. Látka N vykazovala účinnost pouze u dvou ze tří kmenů a to u *M. aurum* a *M. tbc* H37Ra s hodnotami MIC 62,5 µg/ml. Ani jedna z látek se ve svých hodnotách nepřiblížila hodnotám standardů a v případě látky N bylo třeba provést čtyřnásobné ředění. Většina zbývajících látek měla nízkou účinnost s hodnotami MIC 125 µg/ml a víc. Vzhledem k malému počtu účinných sloučenin nelze hodnotit vztah mezi strukturou a účinností.



Ve druhé skupině je zařazených čtrnáct látek. Jedná se o pikolinamidy, nikotinamidy, isonikotinamidy a benzamidy, na které je v různých polohách napojen pyrazin a další substituenty. Nejblíže standardům se se svou MIC dostala GD34 (2-chlor-6-methyl-*N*-(pyrazin-2-yl)isonikotinamid), která inhibovala růst *M. tbc* H37Ra při hodnotě MIC 31,25 µg/ml a *M. aurum* při 62,5 µg/ml. *M. smegmatis* byla v případě této látky inhibována jen částečně. Látky GD64 (3-chlor-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid) a GD66 (4-chlor-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid) vykazovaly pouze u *M. tbc* H37Ra účinnost s MIC 62,5 µg/ml. Zbylé látky neúčinkovaly vůbec nebo minimálně. Stejně jako v první skupině ani zde nelze na základě malého počtu účinných sloučenin hodnotit vztah mezi strukturou a účinností.

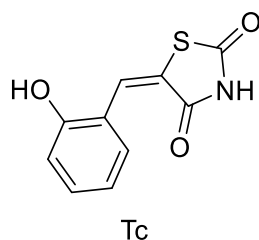


Třetí skupina látek jsou deriváty kyseliny benzoové. Do této skupiny spadá celkem patnáct sloučenin, z nichž většina má jen velmi malou účinnost u jedné nebo u dvou mykobakterií. Čtyři látky, jmenovitě GD33, GD45, GD48 a GDE1 nevykazují žádnou antimikrobiální aktivitu. Látky, které v této skupině vykazují poměrně dobrou účinnost, jsou v obou případech deriváty kyseliny benzoové. První látka je GD38 (2-hydroxy-4-(4-methoxypikolinamid)benzoová kyselina). Velice slibnou účinnost vykazuje proti *M. tbc* H37Ra s hodnotou MIC 31,25 µg/ml. Dvojnásobně vyšší hodnota 62,5 µg/ml byla naměřena u této látky v případě účinku na *M. aurum* a jen částečná účinnost 125 µg/ml u *M. smegmatis*. Druhou látkou s antimikrobiálním účinkem je GD44 (4-(chinolin-2-karboxamid)benzoová kyselina). Účinnost proti *M. tbc* H37Ra je blízko hodnotám standardů s naměřenou MIC 15,625 µg/ml.

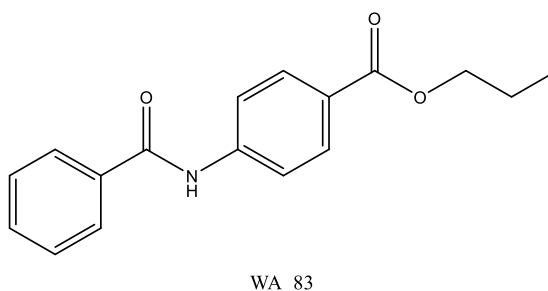


Skupinou s nejlepšími výsledky je skupina čtvrtá, kde byly testovány deriváty thiazolidinu. Nejméně účinnou sloučeninou je látka Tab, která je na rozdíl od ostatních derivátů kyseliny octové a byla výchozí sloučeninou syntézy. Zbylé látky jsou odvozené od thiazolidin-2,4-dionu. Dle vzestupné účinnosti na všechny tři kmeny jsou látky seřazené TAb ((E)-2-(5-benzyliden-2,4-dioxothiazolidin-3-yl)octová kyselina), Tt ((E)-5-(pyridin-2-ylmetylen)thiazolidin-2,4-dion), Tm ((E)-5-(4-chlorbenzyliden)thiazolidin-2,4-dion), Tp a Tr ((E)-5-(3-methoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dion) a ((E)-5-(4-bromobenzyliden)thiazolidin-2,4-dion), Ti(2) ((E)-5-(4-nitrobenzyliden)thiazolidin-2,4-dion), Ta ((E)-5-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dion), Tcc ((E)-5-(4-fluorobenzyliden)thiazolidin-2,4-dion) a Tc ((E)-5-(2-hydroxybenzyliden)thiazolidin-2,4-dion). Na základě látek Tm, Tr a Tcc, které mají jako jeden ze substituentů halogen ve stejné poloze, lze předpokládat, že nejvíce účinný je v případě thiazolidin-2,4-dionu pravděpodobně fluor. Přítomnost halogenu v molekule zvyšuje lipofilitu a hydrofobicitu látky. Navázáním halogenu, v tomto případě chloru a fluoru, se zvětšuje velikost molekuly. Zároveň se zvyšuje polarizace a tím dochází ke zvýšení Londonových disperzních sil, které jsou pro lipofilní látky důležité (Padovani, 2013). Halogenové

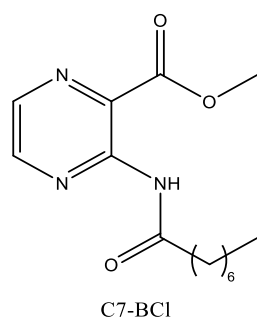
organické fragmenty zejména perfluorované uhlovodíky se obtížněji míchají s vodnými (polárními) rozpouštědly. Bylo prokázáno, že polární rozpouštědla např. voda mají velmi malý vliv na interakční energie a geometrii halogenových aduktů v roztoku. Halogenové vazby lze považovat za hydrofóbní ekvivalent hydrofilních vodíkových vazeb (Priimagi, 2013). Dle substituentů na látkách Tp, Ta a Tc lze předpokládat, že methoxy skupina snižuje účinnost látky, kdežto hydroxy skupina ji zvyšuje. Obecně alkoxy skupina, hlavně methoxy, navázaná na benzenový kruh, snižuje lipofilitu. Dochází k tomu díky produkci hydroxy skupin, které zvyšují rozpustnost ve vodě a podporují eliminaci metabolitu s následným ukončením účinku látky (El – Haj, 2018). Vliv na účinnost látky mají pravděpodobně substituenty, jelikož struktura thiazolidin-2,4-dionu zůstávala neměnná. Látka Tc se nejvíce přiblížila účinnosti standardů u všech tří mykobakterií. *M. smegmatis* a *M. tbc* H37Ra inhibovala při 31,25 µg/ml a *M. aurum* při 15,625 µg/ml. Nejméně na tuto skupinu látek reagovala *M. smegmatis*.



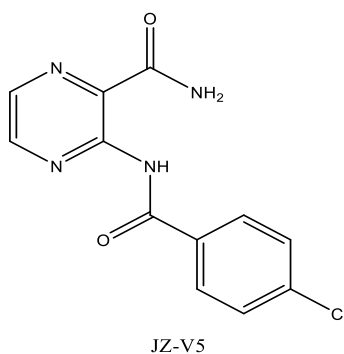
Pátá skupina zahrnuje deriváty benzamidu s kys. benzoovou. Celkem je zde devatenáct sloučenin, které z velké části nemají žádnou či pouze velmi nízkou antimikrobiální účinnost. Nejlepší účinnost měla proti *M. smegmatis* látka WA_83 (propyl 4-benzamidbenzoát) s naměřenou hodnotou MIC 31,25 µg/ml. Ovšem u zbylých mykobakterií byla účinnost nulová. Další látka, která byla alespoň částečně účinná, je WA_61. Ta vykazovala vyšší účinnost u *M. tbc* H37Ra, nižší u *M. aurum* a žádnou účinnost u *M. smegmatis*. Na *M. smegmatis* byla mírně účinná sloučenina WA_70, na *M. aurum* měly mírný účinek látky WA_70 a WA_71 a na *M. tbc* H37Ra měly mírný účinek látky WA_63, WA_65, WA_70, WA_71, WA_72, WA_74, WA_75, WA_76 a WA_77.



Poslední šestou skupinou jsou sloučeniny pyrazinkarboxamidu. Celkem bylo testováno 13 karboxamidů a 4 karboxyláty. Mezi karboxyláty vykazovala malou účinnost u všech tří mykobakterií pouze látka s kódem C7-BCI (methyl 3-oktanamidpyrazin-2-karboxylát). Další dva karboxyláty, které vykazovaly alespoň nízkou účinnost u *M. tuberculosis* H37Ra, byly 2F-BCI, methyl 3-(2-fluorbenzamid)pyrazin-2-karboxylát, a 3F-BCI, methyl 3-(3-fluorbenzamid)pyrazin-2-karboxylát. Látka 4F-BCI neměla žádnou antimikrobiální účinnost. Podle těchto tří látek se dá předpokládat, že pozice 2- a 3- na (fluorbenzamid)pyrazinové skupině zvyšuje nepatrně účinnost látky.



Z karboxamidů vykazovala nejlepší účinnost látka JZ-V5 (3-(4-chlorbenzamid)pyrazin-2-karboxamid). Látka byla sice hůře rozpustná, muselo dojít ke dvojnásobnému ředění, ale hodnoty MIC u *M. smegmatis* a *M. tuberculosis* H37Ra dosáhly hodnot standardů. Významných hodnot dosáhla také látka JZ-V9 (3-(4-(*tert*-butyl)benzamido)pyrazin-2-karboxamid), u které byly u *M. smegmatis* a *M. tuberculosis* H37Ra hodnoty blízké standardům. V případě této látky zůstávala v roztoku suspenze i přes to, že bylo provedeno čtyřnásobné ředění. Nižší účinnost v porovnání s těmito látkami vykazovala JZ-V1, která účinkovala opět na *M. smegmatis* a *M. tuberculosis* H37Ra. Rozdílem mezi neúčinnou látkou JZ-V6 a JZ-V5 je pouze poloha chloru. Je pravděpodobné, že chlor v pozici 4- zvyšuje účinek látky.



Při porovnání všech účinných látek a jejich struktur se jeví jako více účinné látky se substituovaným chlorem, *tert*-butylovou skupinou nebo hydroxy skupinou. Látky s těmito substituenty pravděpodobně snadněji pronikají přes mykomebránu mykobakterie, a to buď díky vyšší lipofilitě způsobené substituenty, například chlorem, nebo díky schopnosti hydroxy skupiny tvořit vodíkové můstky. Jednotlivé testované kmeny vykazovaly rozdílnou citlivost k látkám. Nejméně bylo látkami ovlivněno *M. smegmatis*, oproti tomu nejvíce bylo ovlivněno *M. tbc* H37Ra.

Vzhledem k využití rychle rostoucích mykobakterií a pouze oslabeného kmene *M. tuberculosis* by bylo vhodné na testování navázat s plnohodnotným kmenem *M. tuberculosis* a případně dalšími NTM. Dále je třeba mít na paměti, že látky, které se jeví jako potencionálně účinné na mikrotitrační destičce budou účinné *in vivo*.

8. ZÁVĚR

V této diplomové práci byly v rámci teoretické části přehledně shrnuty informace o atypických mykobakteriích, nemocích jimi způsobených a byly dány do kontextu s výskytem a zvládním problematiky tuberkulózy.

V práci bylo mikrodiluční bujónovou metodou otestováno 88 látek s potencionálním antimykobakteriálním účinkem. Látky byly dodány do laboratoře z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Testování účinnosti jednotlivých látek proběhlo v laboratoři Katedry Biologických a lékařských věd na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Jako testovací kmeny byly použity *M. smegmatis*, *M. aurum* a *M. tbc* H37Ra. Z celkových 88 látek prokázalo účinnost 20 látek a naprosto bez účinku bylo 29 látek. Na všech třech zkoumaných kmenech byla potvrzena antimykobakteriální účinnost pouze u 2 látek (maximální hodnota MIC 62,5 µg/ml). Nejúčinnější skupinou potencionálních antimykotik jsou deriváty thiazolidin-2,4-dionu, které všechny vykazovaly antimikrobiální účinek.

Testované látky mají potenciál k využití v klinické praxi, kde by mohly být využívány jako léčiva. Potřebou je ovšem nejdříve provést další testování *in vitro* a *in vivo*.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

ABC	ATP – Binding-Cassette
AG	arabino-galaktan
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ART	acidorezistení tyčky
ATB	antibiotika
ATP	adenosintrifosfát
ATS	American Thoracic Society
BCG	bacillus Calmette-Guérin
BTS	British thoracic society
CIP	ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMB	ethambutol
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
H ₂ SO ₄	kyselina sírová
HCl	kyselina chlorovodíková
HIV	z angl. Human Immunodeficiency Virus
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRCT	Výpočetní tomografie s vysokým prostorovým rozlišením
CHOPN	chronická obstrukční nemoc plic
IDSA	Infectious Diseases of America
INH	isoniazid

MAC	<i>Mycobacterium avium</i> komplex
MALDI – TOF MS	Matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry
MATE	Multidrug And Toxic compound Extrusion
MFS	Major Facilitator Superfamily
MIC	minimální inhibiční koncentrace
<i>M. tbc</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NALC	<i>N</i> -acetyl-L-cystein
NaOH	hydroxid sodný
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory
NTM	netuberkulózní mykobakterie
ODD	orphan drug designation
OSN	Organizace spojených národů
PCR	polymerázová řetězová reakce – analýza
PCR– RFLP	polymerázová řetězová reakce polymorfismu restrikčních fragmentů
PZA	pyrazinamid
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
RND	Resistance Nodulation cell Division
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SMR	small multidrug resistance
SPS	polyanetholsulfonát sodný

STM	streptomycin
TBC	tuberkulóza
USA	United States of America
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
WHO	Světová zdravotnická organizace

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Chemotypizace acidorezistentních a příbuzných bakterií	10
Tabulka 2 - Výskyt předpokládaných onemocnění vředu Buruli mezi lety 2016–2020.	26
Tabulka 3 - Kvantitativní hodnocení nálezu mykobakterií v mikroskopickém preparátu – Ziehl-Neelsenovo barvení	42
Tabulka 4 - Kvantitativní hodnocení nálezu mykobakterií v mikroskopu – fluorescenční barvení.....	42
Tabulka 5 - Kvantitativní hodnocení kultivace NTM.....	43
Tabulka 6 - 1. skupina látek (deriváty pyridin-2-ylbenzamidů)	61
Tabulka 7 - 2. skupina látek (deriváty pyrazin-2-ylnikotinamidu, pikolinamidu a benzamidů).....	63
Tabulka 8 - 3. skupina látek (deriváty amidů kyseliny benzoové)	66
Tabulka 9 - 4. skupina látek (deriváty thiazolidin-2,4-dionů)	69
Tabulka 10 - 5. skupina látek (amidy benzoové kyseliny a aminobenzoové kyseliny) .	71
Tabulka 11 - 6. skupina látek (deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny)	75
Tabulka 12 - Standardy antituberkulotik	80
Tabulka 13 - Výsledky testování 1. skupiny látek.....	87
Tabulka 14 - Výsledky testování 2. skupiny látek.....	88
Tabulka 15 - Výsledky testování 3. skupiny látek.....	89
Tabulka 16 - Výsledky testování 4. skupiny látek.....	90
Tabulka 17 - Výsledky testování 5. skupiny látek.....	91
Tabulka 18 - Výsledky testování 6. skupiny látek.....	92
Tabulka 19 - Výsledky testování standardů.....	93

11. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Incidence výskytu NTM na území ČR v letech 2016 - 2019. (zdroj: Losse, 2019; ÚZIS, 2018; ÚZIS, 2019).....	21
--	----

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1 - Diagram základních komponent buněčné stěny mykobakterií (AG – arabino-galaktan) (převzato a upraveno Hett, 2008) 13
- Obrázek 2 - Kultivace *M. marinum* na agarových půdách Middlebrook 7H11 vykazující fotochromogenní charakteristiku. A) Kultivace ve tmě a růst bílých či světle zbarvených kolonií B) Po vystavení světlu zbarvení do zářivě žluté (zdroj: Ho, 2011)..... 15
- Obrázek 3 - Kultivace *M. gordonae* na Löwenstein-Jensenově půdě (A, B) a na Ogawavově půdě (C) (zdroj: Microbiology pictures) 16
- Obrázek 4 - Růst *M. haemophilum* na Löwenstein – Jensenově půdě. Vlevo bez růstu, vpravo růst mykobakterie na půdě s přídatkem citrátu železito – amonného. (zdroj: Kelley, 2011)..... 17
- Obrázek 5 - Klinický projev NTM cervikofaciální lymfadenitidy. (Willemse, 2018) ... 24
- Obrázek 6 - Mapa celosvětového výskytu vředu Buruli. (van der Werf, 1999)..... 25
- Obrázek 7 - Klinické formy vředu Buruli A) tvrdý uzlík, B) plak, C) edém, D) vřed (zdroj: Wadagni, 2015)..... 27
- Obrázek 8 - Asymptomatický erytematózní, šupinatý uzlík nad proximálním interfalangeálním kloubem pravého ukazováčku způsobený *M. marinum* A) Erytematózní, šupinatý uzlík nad pravým ukazováčkem B) Téměř úplná regrese léze po dvouměsíční léčbě doxycyklinem. (zdroj: Assiri, 2019)..... 30
- Obrázek 9 - Fibrokavitární forma onemocnění způsobené *M. avium* komplex. Sken pořízený výpočetní tomografií s vysokým prostorovým rozlišením (HRCT) ukazuje velkou dutinu v levém plicním laloku (černá šipka) (zdroj: Bonaiti, 2015)..... 34
- Obrázek 10 - HRCT sken 69leté ženy s komplexním onemocněním *M. avium* intracellulare. Transaxiální tenký řez (tloušťka 2,5 mm) získaný na úrovni bronchus intermedius ukazuje více kavitárních uzlin (hroty šípů) v obou plicích. Patrné jsou také malé uzlíky (černé šipky) a bronchiektázie (bílé šipky). (zdroj: Chung, 2005)..... 35
- Obrázek 11 - *M. tuberculosis* barvené metodou dle Ziehl – Neelsena (zvětšení 1000×). Vzorek získán ze zánětlivého infiltrátu perikardu (zdroj: Man, 2016)..... 41
- Obrázek 12 - Fotografie z mikroskopu – nátěr sputa barvený auraminem O ukazující bacily TBC - fluorescenční mikroskopie (zvětšení 200×) (zdroj: Khatun, 2011) 42
- Obrázek 13 - Schéma fungování MALDI-TOF (zdroj: Martin, 2017)..... 47
- Obrázek 14 - Spektrální profily MALDI – TOF a charakteristické píky pro každý ze tří poddruhů *M. abscessus*. Přesná analýza pomocí softwaru ClinProTool zvýraznila pět diskriminačních píků (m/z 2081, 3123, 3378, 3463, a 3378). (zdroj: Fangous, 2014)..... 47
- Obrázek 15 - Výsledky testování na lékovou citlivost VNM7: izolát *M. tuberculosis* rezistentní na INH. VNM33: izolát *M. tuberculosis* rezistentní na INH, RIF, STM. Fotografie z 11. dne kultivace. V řadě A se nachází pozitivní kontroly

s <i>M. tuberculosis</i> v nárůstu 105 CFU/ml a s 103 CFU/ml. (zdroj: Nguyen, 2015).....	49
Obrázek 16 - Přehled mykobakteriální buněčné stěny a determinant rezistence. (zdroj: Van Ingen, 2012)	53
Obrázek 17 - Léčiva v různých fázích klinického výzkumu určená pro léčbu plicního onemocnění způsobeného NTM (zdroj: Wu, 2018)	56
Obrázek 18 - Růst <i>M. aurum</i> DSM 43999 na agaru Middlebrook 7H10. (zdroj: DSMZ)	58
Obrázek 19 - Růst <i>M. smegmatis</i> na TSY agaru. (zdroj: Science Prof online)	59
Obrázek 20 - Růst <i>M. tuberculosis</i> H37Ra na Middlebrook 7H9 agaru (zdroj: O. Jand'ourek).....	60
Obrázek 21 - Schéma mikrotitrační destičky. H2O – sterilní voda, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola, jamky 2-9 - testované látky v koncentracích od 500 µg/ml do 3,91 µg/ml.	84
Obrázek 22 - Nahoře: Přeměna nefluorescenčního modrého resazurinu na růžový fluorescenční resorufin. Dole: Mikrotitrační destička ukazující konverzi modrého resazurinu na růžový resorufin (buňky postupně ztrácejí svou životaschopnost zprava doleva). (Sarvazyan, 2020)	85
Obrázek 23 - Ukázka testování pro látky s antimykobakteriálním účinkem. Mikrotitrační destička inkubována s <i>Mycobacterium aurum</i> . (Zdroj: autor práce)	86

13. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) ABGUEGUEN, P., RABIER, V., MAHAZA, CH., WAROT, A., CHENNEBAULT, J. M., PICHARD, E. *Mycobacterium malmoense*: an underestimated nontuberculous mycobacterium. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. **2010**, 66(1), 98-100. ISSN 07328893. Dostupné z: doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.07.004
- 2) ACHARYA, T. Ziehl-Neelsen technique (AFB Staining): Principle, Procedure and reporting – Learn Microbiology Online. Home – Learn Microbiology. (**2013**). Online [online]. Copyright © 2021 . Dostupné z: <https://microbeonline.com/ziehl-neelsen-technique-principle-procedure-reporting/>
- 3) AMLEROVÁ, J., ČERMÁK P., SVOBODOVÁ J., ULMANN V., ZEMANOVÁ I. (**2014**) Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění: Národní standardní vyšetřovací postup [online]. Dostupné z: https://docplayer.cz/7717249-Nsvp_7-zakladni-mikrobiologicka-diagnostika-mykobakterialnich-onemocneni.html
- 4) ASSIRI, A., EUVRARD, S., KANITAKIS, J. Cutaneous *Mycobacterium Marinum* Infection (Fish Tank Granuloma) in a Renal Transplant Recipient: Case Report and Literature Review. *Cureus* [online] **2019**, 28;11(10):e6013. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.6013
- 5) BARBERIS, I., BRAGAZZI, N. L., GALLUZZO, L., MARTINI, M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. [online] **2017**, 58(1): E9-E12. PMID: 28515626; PMCID: PMC5432783.
- 6) BAYOT, M. L., MIRZA, T. M., SHARMA, S. Acid Fast Bacteria. (2021) [Updated 2020 May 23]. In: StatPearls [internet]. Treasure Island (FL): StatPearls. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537121/>
- 7) BIO – RAD. What is alamarBlue? Bio-Rad Antibodies | Reagents, Antigens & Kits | Formerly AbD Serotec [online]. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/alamarblue-cell-viability-assay-resazurin.html>
- 8) BIOCOMPARE. The Buyer's Guide for Life Scientists. Biocompare: The Buyer's Guide for Life Scientists [online]. Dostupné z: <https://www.biocompare.com/26047-Resazurin-Alamar-Blue-Dyes/>
- 9) BIOSPACE. Spero Therapeutics Provides Update on SPR720 Phase 2 a Clinical Trial | BioSpace. Biotech, Pharmaceutical and Clinical Research Jobs [online]. Copyright ©

- 1985 Dostupné z: <https://www.biospace.com/article/releases/spero-therapeutics-provides-update-on-spr720-phase-2a-clinical-trial/>
- 10) BONAITI, G., PESCI, A., MARRUCHELLA, A., LAPADULA, G., GORI, A., ALIBERTI, S. Nontuberculous Mycobacteria in Noncystic Fibrosis Bronchiectasis. *BioMed Research International* [online]. **2015**, 2015, 1-8 . ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2015/197950
 - 11) CLAPPER, W. E. *Mycobacterium fortuitum* Abscess at Injection Site. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* [online]. **1967**, 202(6) . ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.1967.03130190156034
 - 12) DALEY, CH. L., SCHLOSSBERG, D. *Mycobacterium avium* Complex Disease. *Microbiology Spectrum* [online]. **2017**, 5(2) . ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0045-2017
 - 13) DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* [online]. **2006**, 100(11), 1862-1870 . ISSN 09546111. Dostupné z: doi:10.1016/j.rmed.2006.08.006
 - 14) DE WAARD, J., ROBLEDO, J. Chapter 12: Conventional Diagnostic Methods. *Tuberculosis*. **2007**
 - 15) Diluční metoda. Ústav laboratorní diagnostiky [online]. Praha . Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm>
 - 16) DSMZ. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Welcome to the Leibniz Institute DSMZ [online]. Copyright © Dostupné z: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-43999>
 - 17) EL-HAJ, B., AHMED, S., GARAWI, M., ALI, H. Linking Aromatic Hydroxy Metabolic Functionalization of Drug Molecules to Structure and Pharmacologic Activity. *Molecules* [online]. **2018**, 23(9) . ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23092119
 - 18) EUCAST: Methodology for AST in Mycobacteria. EUCAST: EUCAST [online]. Copyright. Version 6.1. 4th of July, **2019**. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Mycobacteria/Methods_in_AMST/Technical_protocol_AMST_MIC_reference_method_190719.pdf
 - 19) FITZGERALD, D. W., R. STERLING, T. R., HAAS, D. W. *Mycobacterium tuberculosis*. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases [online]. Elsevier, **2015**, 2787-2818.e5 . ISBN 9781455748013. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-4801-3.00251-4

- 20) FORBES, B. A., HALL, G. S., MILLER, M. B., NOVAK, S. M., ROWLINSON, M., SALFINGER, M., SOMOSKÖVI, A., WARSHAUER, D. M., WILSON, M. L. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **2018**, 31(2) ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00038-17
- 21) FORBES, B. A., KRAFT, C. S. Mycobacterial Taxonomy. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **2017**, 55(2), 380-383 ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01287-16
- 22) FRANCO-SOTOMAYOR, G., RIVERA-OLIVERO, I. A., LEON-BENITEZ, M., URUCHIMA-CAMPOVERDE, S. E., CARDENAS-FRANCO, G., PERDOMO-CASTRO, M. E., CARDENAS-FRANCO, C. S., ORTEGA-VIVANCO, J., ABAD-RUIZ, A. S., DE WAARD, J. H., GARCIA-BEREQUIAIN, M. A. Fast, Simple, and Cheap: the Kudoh-Ogawa Swab Method as an Alternative to the Petroff–Lowenstein-Jensen Method for Culturing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **2020**, 58(4) . ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01424-19
- 23) GARCIA-MARCOS, P. W., PLAZA-FORNIELES, M., MENASALVAS-RUIZ, A., RUIZ-PRUNEDA, R., PAREDES-REYES, P., MIGUELEZ, S. A. Risk factors of non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis in children: a case–control study. *European Journal of Pediatrics* [online]. **2017**, 176(5), 607-613 . ISSN 0340-6199. Dostupné z: doi:10.1007/s00431-017-2882-3
- 24) GLASSROTH, J. Pulmonary Disease Due to Nontuberculous Mycobacteria. *Chest* [online]. **2008**, 133(1), 243-251 . ISSN 00123692. Dostupné z: doi:10.1378/chest.07-0358
- 25) GONZALO-ASENSIO, J., PÉREZ, I., AGUILÓ, N., URANGA, S., PICÓ, A., LAMPREAVE, C., CEBOLLADA, A., OTAL, I., SAMPER, S., MARTÍN, C. New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its dynamic distribution between *Mycobacterium tuberculosis* Complex lineages. *PLOS Genetics* [online]. **2018**, 14(4) . ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1007282
- 26) GRAY, S. F., SMITH, R. S., REYNOLDS, N. J., WILLIAMS, E. W. Fish tank granuloma. *BMJ* [online]. **1990**, 300(6731), 1069-1070 . ISSN 0959-8138. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.300.6731.1069
- 27) GREENWOOD, D., SLACK, R. C. B., PEUTHERER J.F. *Lékařská mikrobiologie*. 1 vydání. Praha: Grada, **1999**. ISBN 80-7169-365-0.

- 28) GRIFFITH, D. E., AKSAMIT, T., BROWN-ELLIOTT, B. A., CATANZARO, A., DALEY, CH., GORDIN, F., HOLLAND, S. M., HORSBURGH, R., HUITT, G., IADEMARCO, M. F., ISEMAN, M., OLIVIER, K., RUOSS, S., FORDHAM VON REYN, C., WALLACE JR., R. J., WINTHROP, K. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. **2007**, 175(4), 367-416 . ISSN 1073449X. Dostupné z: doi:10.1164/rccm.200604571ST
- 29) HEIFETS, L. Mycobacterial Infections Caused by Nontuberculous Mycobacteria. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. **2004**, 25(3), 283-. ISSN 1069-3424. Dostupné z: doi:10.1055/s-2004-829501
- 30) HEINRICHS, M. T., MAY, R. J., HEIDER, F., REIMERS, T., SY, B., SK. B., PELOQUIN, CH. A., DERENDORF, H. *Mycobacterium tuberculosis* Strains H37ra and H37rv have equivalent minimum inhibitory concentrations to most antituberculosis drugs. *International Journal of Mycobacteriology* [online]. **2018**, 7(2) . ISSN 2212-5531. Dostupné z: doi:10.4103/ijmy.ijmy_33_18
- 31) HETT, E. C., RUBIN, E. J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. **2008**, 72(1), 126-156 . ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00028-07
- 32) HOEFSLOOT, W., VAN INGEN, J., ANDREJAK, C., ÄNGEBY, K., BAURIAUD, R., BEMER, P., BEYLIS, N., BOEREE, M. J., CACHO, J., CHIHOTA, V., CHIMARA, E., CHURCHYARD, G., CIAS, R., DAZA, R., DALEY, CH. L., DEKHUIJZEN, P. N. L., DOMINGO, D., DROBNIEWSKI, F., ESTEBAN, J., FAUVILLE-DUFAUX, M., FOLKVARSEN, D. B., GIBBONS, N., GÓMEZ-MAMPASO, E., GONZALEZ, R., HOFFMANN, H., HSUEH, P., INDRA, A., JAGIELSKI, T., JAMIESON, F., JANKOVIC, M., JONG, E., KEANE, J., KOH, W., LANGE, B., LEAO, S., MACEDO, R., MANNSSÅKER, T., MARRAS, T. K., MAUGEIN, J., MILBURN, H. J., MLINKÓ, T., MORCILLO, N., MORIMOTO, K., PAPAVENTSIS, D., PALENQUE, E., PAEZ-PEÑA, M., PIERSIMONI, C., POLANOVÁ, M., RASTOGI, N., RICHTER, E., RUIZ-SERRANO, M. J., SILVA, A., PEDRO DA SILVA, M., SIMSEK, H., VAN SOOLINGEN, D., SZABÓ, N., THOMSON, R., TÓRTOLA FERNANDEZ, T., TORTOLI, E., TOTTEN, S. E., TYRRELL, G., VASANKARI, T., VILLAR, M., WALKIEWICZ, R., WINTHROP, K. L., WAGNER, D. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET

- collaborative study. *European Respiratory Journal* [online]. **2013**, 42(6), 1604-1613 ISSN 0903-1936. Dostupné z: doi:10.1183/09031936.00149212
- 33) CHALMERS, J.D., AKSAMIT, T., A.C.C. CARVALHO, A. C. C., RENDON, A., FRANCO, I. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Pulmonology* [online]. **2018**, 24(2), 120-131 . ISSN 25310437. Dostupné z: doi:10.1016/j.pulmoe.2017.12.005
- 34) CHAPMAN, J. S. Atypical Mycobacterial Infections: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. *Medical Clinics of North America* [online]. **1967**, 51(2), 503–517. doi:10.1016/s0025-7125(16)33070x
- 35) CHIN, K. L., SARMIENTO, M. E., ALVAREZ-CABRERA, N., NORAZMI, M. N., a ACOSTA, A. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections: current state and future management. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. **2020**, 39(5), 799-826 . ISSN 0934-9723. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-019-03771-0
- 36) CHUNG, M. J., LEE, K. S., KOH, W.-J., LEE, J.-H., KIM, T. S., KWON, O. J., KIM, S. Thin-Section CT Findings of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Diseases: Comparison Between *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex and *Mycobacterium abscessus* Infection. *Journal of Korean Medical Science* [online]. **2005**, 20(5) . ISSN 1011-8934. Dostupné z: doi:10.3346/jkms.2005.20.5.777
- 37) JACKSON, P.G., KEEN, H., NOBLE, C. J., SIMMONS, N. A. Injection abscesses due to *Mycobacterium chelonae* occurring in a diabetic patient. *Tubercle* [online]. **1981**, 62(4), 277-279 . ISSN 00413879. Dostupné z: doi:10.1016/S0041-3879(81)80008-6
- 38) JOHNSON M.M., ODELL J.A., Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*. **2014**;6(3):210-220.Dostupné z: doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.24
- 39) JOHNSTON, J. C., CHIANG, L., ELWOOD, K., SCHLOSSBERG, D. *Mycobacterium kansasii*. *Microbiology Spectrum* [online]. **2017**, 5(1) . ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0011-2016
- 40) JULÁK, J. Úvod do lékařské bakteriologie. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, **2015**. ISBN 978-80-246-3210-0.
- 41) JURINKE, CH., OETH, P., VAN DEN BOOM, D. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis. *Molecular Biotechnology* [online]. **2004**, 26(2), 147-164 . ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1385/MB:26:2:147

- 42) KELLEY, C., ARMSTRONG, F. W. S., EATON, M. E. Disseminated *Mycobacterium haemophilum* infection. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. **2011**, 11(7), 571-578 . ISSN 14733099. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(11)70029-9
- 43) KHATUN, Z., KAMAL, S. M., CHANDAN, R., SULTANA, T., RAHMAN, M., AZAD, M., AHMED, A. Usefulness of Light Emitting Diode (LED) fluorescent microscopy as a tool for rapid and effective method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Bangladesh Medical Research Council bulletin*. **2011**, 37. 7-10. Dostupné z: 10.3329/bmrcb.v37i1.7792.
- 44) KIMBALL K. ARCHIVES WEST: ERNEST H. RUNYON PAPERS, **1884-1999**. Archives West [online]. Dostupné z: <http://archiveswest.orbiscascade.org/ark:/80444/xv40850/op=fstyle.aspx?t=k&q=runyon>
- 45) KRÁLOVCOVÁ M., KARVUNIDIS, T., RADĚJ, J., MATĚJOVIČ, M. Netuberkulózní mykobakteriální onemocnění: review na podkladě kazuistiky. *Vnitřní Lékařství* **2019**; 65(5): 369–375
- 46) KUBICA, G. History of MAC – Mac Lung. *Mac Lung* [online]. Dostupné z: <https://www.maclungdisease.org/history-of-mac/>
- 47) KUO, A – J., CHUANG, W-Y., CHAN, K-CH., HO, W-L. Nasal Fish Tank Granuloma: An Uncommon Cause for Epistaxis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [online]. **2011**, 85(2), 195-196 ISSN 0002-9637. Dostupné z: doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0197
- 48) KWON, Y-S, KOH, W-J., DALEY, CH. L. Treatment of *Mycobacterium avium* Complex Pulmonary Disease. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* [online]. **2019**, 82(1) . ISSN 1738-3536. Dostupné z: doi:10.4046/trd.2018.0060
- 49) LAUDONE, T.W., GARNER, L., KAM, CH. W., ESTHER, CH. R., MCKINZIE, C. J. Novel therapies for treatment of resistant and refractory nontuberculous mycobacterial infections in patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* [online]. **2021**, 56(S1). ISSN 8755-6863. Dostupné z: doi:10.1002/ppul.24939
- 50) LOEBINGER, M. R. *Mycobacterium avium* complex infection: phenotypes and outcomes. *European Respiratory Journal* [online]. **2017**, 50(3) . ISSN 0903-1936. Dostupné z: doi:10.1183/13993003.01380-2017
- 51) LOSSE, S. Netuberkulózní mykobakteriální onemocnění – editorial. *Vnitřní lékařství*. **2019**, 2019(5), 333-336. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/vnitri-lekarstvi/2019-5/netuberkulozni-mykobakterialni-onemocneni-editorial-112421>

- 52) MAN, M., MIMI, N., STRÂMBU, L., FLORESCU, C., STREBA, C., ANTIGONA, T. Tuberculous constrictive pericarditis complicated with tuberculous mediastinitis – Case report. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie. **2016**, 57. 237-242. Dostupné z: PMID: 27151714.
- 53) MARTIN, I.W. Mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory [online]. Elsevier, **2017**, 2017, s. 231-245 . ISBN 9780128008713. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800871-3.00011-0
- 54) MEEHAN, C. J., BARCO, R. A., LOH, Y.-H. E., COGNEAU, S., RIGOUTS, L. Reconstituting the genus *Mycobacterium*. **2021**. Dostupné z: doi:10.1101/2021.03.11.434933
- 55) MELTER, O., MALMGREN, A. Principy a praktika lékařské mikrobiologie. 1. vydání. Praha: Karolinum, **2014**. ISBN 9788024625454.
- 56) MICROBIOLOGY IN PICTURES. Acid-fast rods, acid-fast Ziehl-Neelsen stain of *Mycobacterium tuberculosis* bacilli from culture. Microbiology pictures – photo gallery of medically important bacteria. Microbiology in pictures, bacteria images and photographs with texts. On-line photo atlas of bacteria. [online]. Dostupné z: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/mycobacterium%20tuberculosis%20photos/MYTU17.html>
- 57) MICROBIOLOGY IN PICTURES. *Mycobacterium gordonae* on L-J and Ogawa medium. Scotochromogenic mycobacteria. Microbiology pictures – photo gallery of medically important bacteria. Microbiology in pictures, bacteria images and photographs with texts. On-line photo atlas of bacteria. [online]. Dostupné z: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/mycobacterium-tuberculosis-photos/mycobacterium-gordonae.html>
- 58) MISKOFF, J. A., CHAUDHRI, M. *Mycobacterium Chimaera*: A Rare Presentation. Cureus [online], **2018** 6;10(6):e2750. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.2750
- 59) MORCILLO, N. New simple decontamination method improves microscopic detection and culture of mycobacteria in clinical practice. Infection and Drug Resistance [online]. **2008**, 1:21-26. ISSN 1178-6973. Dostupné z: doi:10.2147/IDR.S3838
- 60) MURRAY, P. R. The Clinician and the Microbiology Laboratory. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases [online]. Elsevier, **2015**, 2015, s. 191-223 . ISBN 9781455748013. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-4801-3.00016-

- 61) NGEOW, Y. F., WONG, Y. L., TAN, J. L., HONG, K. W., NG, H. F., ONG, B. L., CHAN, K. G., HOSHINO, Y. Identification of New Genomespecies in the *Mycobacterium terrae* Complex. PLOS ONE [online]. **2015**, 10(4) . ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0120789
- 62) NGUYEN, V.A.T., NGUYEN, H. Q., VU, T. T., NGUYEN, N. A. T., DUONG, C. M., TRAN, T. H. T., NGUYEN, H. V., DANG, D. A., BANULS, L. Reduced turn-around time for *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing with a proportional agar microplate assay. Clinical Microbiology and Infection [online]. **2015**, 21(12), 1084-1092 . ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmi.2015.08.024
- 63) OLIVAS-MAZÓN, R., BLÁZQUEZ-GAMERO, D., ALBERTI-MASGRAU, N., LÓPEZ-ROA, P., DELGADO-MUÑOZ, M. D., EPALZA, C. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial lymphadenitis: the role of fine-needle aspiration. European Journal of Pediatrics [online]. **2021**, 180(4), 1279-1286 . ISSN 0340-6199. Dostupné z: doi:10.1007/s00431-020-03875-2
- 64) PADOVANI D. Why do halogen substituents make molecules more lipophilic?. ResearchGate | Find and share research [online]. 2013. Dostupné z: https://www.researchgate.net/post/Why_do_halogen_substituents_make_molecules_more_lipophilic
- 65) PALARASAH, Y., SKJOEDT, M-O., VITVED, L., ANDERSEN, T. E., SKJOEDT, K., KOCH, C. Sodium Polyanethole Sulfonate as an Inhibitor of Activation of Complement Function in Blood Culture Systems. Journal of Clinical Microbiology [online]. **2010**, 48(3), 908-914. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01985-09
- 66) PEREIRA, A. C., RAMOS, B., REIS, A. C., CUNHA, M. V. Non-Tuberculous Mycobacteria: Molecular and Physiological Bases of Virulence and Adaptation to Ecological Niches. Microorganisms [online]. **2020**, 8(9) . ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8091380
- 67) PETRINI, B. Non-tuberculous mycobacterial infections. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [online]. **2009**, 38(4), 246-255 . ISSN 0036-5548. Dostupné z: doi:10.1080/00365540500444652
- 68) PHELAN, J., MAITRA, A., MCNERNEY, R., NAIR, M., GUPTA, A., COLL, F., PAIN, A., BHAKTA, S., CLARK, T. G. The draft genome of *Mycobacterium aurum*, a potential model organism for investigating drugs against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. International Journal of Mycobacteriology [online]. **2015**, 4(3), 207-216 . ISSN 22125531. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijmyco.2015.05.001

- 69) PORVAZNIK, I., SOLOVIČ I., MOKRÝ, J. Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy. POKORSKI, Mieczyslaw, ed. Respiratory Treatment and Prevention [online]. Cham: Springer International Publishing, **2017**, 2016-7-12, s. 19-25. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-3-319-44487-1. Dostupné z: doi:10.1007/5584_2016_45
- 70) PREVOTS, D., LODDENKEMPER, R., SOTGIU, R., MIGLIORI, G. A., BATTISTA, G. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an increasing burden with substantial costs. European Respiratory Journal [online]. **2017**, 49(4) . ISSN 0903-1936. Dostupné z: doi:10.1183/13993003.00374-2017
- 71) PRIIMAGI, A., CAVALLO, G., METRANGOLO, P., RESNATI, G. The Halogen Bond in the Design of Functional Supramolecular Materials: Recent Advances. Accounts of Chemical Research [online]. **2013**, 46(11), 2686-2695. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/ar400103r
- 72) PTÁKOVÁ, M. Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterií. Solen. **2011**;8(11):466-468.
- 73) REYRAT, J.-M., KAHN, D. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? Trends in Microbiology [online]. **2001**, 9(10), 472-473. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/S0966-842X (01)02168-0
- 74) SANTIN, M., BARRABEIG, I., MALCHAIR, P., GONZALEZ-LUQUERO, L., BENITEZ, M. A., SABRIA, J., PALAU-BENAVENT, M., CANETE, C., LLORET-QUERALTÓ, J. A., GRIJOTA-CAMINO, M. D., DORCA, J., ALCAIDE, F. Pulmonary Infections with Nontuberculous Mycobacteria, Catalonia, Spain, 1994–2014. Emerging Infectious Diseases [online]. **2018**, 24(6), 1091-1094. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid2406.172095
- 75) SARVAZYAN, N., ed. Tissue Engineering [online]. Cham: Springer International Publishing, **2020**. Learning Materials in Biosciences. ISBN 978-3-030-39697-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-39698-5
- 76) SCIENCE PROF ONLINE. *Mycobacterium* Bacteria Images & Photographs from Science Prof Online. Science Prof Online Free Science Education Website Copyright © 2017 [online]. Dostupné z: <https://www.scienceprofonline.com/science-image-libr/sci-image-libr-mycobacterium-bacteria.html>
- 77) SHAH, N. M., DAVIDSON, J. A., ANDERSON, L. F., LALOR, M. K., KIM, J., THOMAS, H. L., LIPMAN, M., ABUBAKAR, I. Pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* is the main driver of the rise in non-tuberculous mycobacteria incidence in

- England, Wales and Northern Ireland, 2007–2012. BMC Infectious Diseases [online]. **2016**, 16(1). ISSN 1471-2334. Dostupné z: doi:10.1186/s12879-016-1521-3
- 78) SHARMA, S. K., UPADHYAY, V. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. Indian Journal of Medical Research [online]. **2020**, 152(3) . ISSN 0971-5916. Dostupné z: doi:10.4103/ijmr.IJMR_902_20
- 79) SMITH, G. S., GHIO, A. J., STOUT, J. E., MESSIER, K. P., HUDGENS, E. E., MURPHY, M. S., PFALLER, S. L., MAILLARD, J.-M., HILBORN, E. D. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria isolations among central North Carolina residents, 2006–2010. Journal of Infection [online]. **2016**, 72(6), 678-686 . ISSN 01634453. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinf.2016.03.008
- 80) SOLOVIČ, I. Mykobakteriόzy vyvolané netuberkulózní mykobakterie mi – poznatky pre klinickú prax. Dermatológia pre prax [online]. Ružomberok, **2018**, 12(1), 26-30
- 81) SOMOSKOVI, A., MESTER, J., HALE, Y. M., PARSONS, L. M., SALFINGER, M. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. Clinics in Chest Medicine [online]. **2002**, 23(3), 585-597 . ISSN 02725231. Dostupné z: doi:10.1016/S0272-5231(02)00018-7
- 82) SOTO, C. Y., ANDREU, N., GIBERT, I., LUQUIN, M. Simple and Rapid Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra from *M. tuberculosis* Clinical Isolates through Two Cytochemical Tests Using Neutral Red and Nile Blue Stains. Journal of Clinical Microbiology [online]. **2002**, 40(8), 3021-3024 . ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.40.8.3021-3024.2002
- 83) SUNDARSINGH, J. A., RANJITHA, T. J., RAJAN, A., SHANKAR, V. Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Infection and Public Health [online]. **2020**, 13(9), 1255-1264 . ISSN 18760341. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jiph.2020.06.023
- 84) TIÓ-COMA, M., WIJNANDS, T., PIERNEEF, L., SCHILLING, A. K., ALAM, K., ROY, J. CH., FABER, W. R., MENKE, H., PIETERS, T., STEVENSON, K., RICHARDUS, J. H., GELLUK, A. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in soil: multiple needles in the haystack. Scientific Reports 9, 3165 (**2019**). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39746-6>
- 85) TRIPATHI, K., TRIPATHI, P.C., NEMA, S., SHRIVASTAVA, A.K., DWIWEDI, K., DHANVIJAY, A.K. Modified Petroff's Method: an excellent simplified decontamination technique in comparison with Petroff's Method. International Journal of Recent Trends in Science And Technology, **2014**. 10. 461-464.

- 86) TSUKAMURA, M. Adansonian Classification of Mycobacteria. *Journal of General Microbiology* [online]. **1966**, 45(2), 253-273 . ISSN 0022-1287. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-45-2-253
- 87) UNIPROT. *Mycobacterium tuberculosis* (strain ATCC 25177 / H37Ra). [online]. **2020**. Copyright © 2002 . Dostupné z: <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000001988>
- 88) URBÁŠKOVÁ, P., ŽEMLIČKOVÁ, H., HRABÁK, J.: Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům? *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. SZÚ Praha, **2010**, vol. 19, n. 9.
- 89) ÚZIS ČR. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2019. ÚZIS ČR, **2019**. Dostupné z WWW: <www.uzis.cz>.
- 90) ÚZIS ČR. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2018. ÚZIS ČR, **2018**. Dostupné z WWW: <www.uzis.cz>.
- 91) VAN DER WERF, S, T., TA VAN DER GRAAF, W., TAPPERO, J. W., ASIEDU, K. *Mycobacterium ulcerans* infection. *The Lancet* [online]. **1999**, 354(9183), 1013-1018 . ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(99)01156-3
- 92) VAN INGEN, J. Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. **2013**, 34(01), 103-109 . ISSN 1069-3424. Dostupné z: doi:10.1055/s-0033-1333569
- 93) VAN INGEN, J., BOEREE, M. J., VAN SOOLINGEN, D., VAN SOOLINGEN, J. W. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resistance Updates* [online]. **2012**, 15(3), 149-161 . ISSN 13687646. Dostupné z: doi: 10.1016/j.drug.2012.04.001
- 94) VEGA-LÓPEZ, F. *Mycobacterium marinum* Infection. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* [online]. Elsevier, **2020**, 2020, s. 569-570 ISBN 9780323555128. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-55512-8.00064-8
- 95) WADAGNI, A., FRIMPONG, M., PHANZU, M. D., ABLORDEY, A., KACOU, E., GBEDEVI, M., MARION, E., XING, Y., BABU, V. S., PHILLIPS, R. O., WANSBROUGH-JONES, M., KISHI, Y., ASIEDU, K. Simple, Rapid *Mycobacterium ulcerans* Disease Diagnosis from Clinical Samples by Fluorescence of Mycolactone on Thin Layer Chromatography. *PLOS Neglected Tropical Diseases* [online]. **2015**, 9(11) . ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0004247
- 96) WANGER, A., CHAVEZ, V., HUANG, R. S. P., WAHED, A., ACTOR, J. K., DASGUPTA, A. Biochemical Tests and Staining Techniques for Microbial Identification. *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology* [online]. Elsevier,

- 2017, 2017, s. 61-73 ISBN 9780128053515. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805351-5.00005-3
- 97) WIKLER, M., Clinical Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard. (2018) ISBN 1-56238-837-1.
- 98) WILLEMSE, S.H., OOMENS, M.A.E.M., DE LANGE, J., KARSSSEMAKERS, L.H.E. Diagnosing nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children: A systematic review. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology [online]. 2018, 112, 48-54 . ISSN 01655876. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijporl.2018.06.034
- 99) WOLINSKY E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. The American review of respiratory disease, 1979. 119(1), 107–159. Dostupné z: doi:10.1164/arrd.1979.119.1.107
- 100) WORLD HEALTH ORGANIZATION Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection) [online]. 2021 . Dostupné z: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Buruli-ulcer-\(mycobacterium-ulcerans-infection\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Buruli-ulcer-(mycobacterium-ulcerans-infection))
- 101) WORLD HEALTH ORGANIZATION Global tuberculosis report 2020: executive summary. 2020. ISBN 978-92-4-001610-1.
- 102) WU, M-L., AZIZ, D. B., DARTOIS V., DICK, T. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. Drug Discovery Today [online]. 2018, 23(8), 1502-1519 . ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2018.04.001