

Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterií

MUDr. Miluška Ptáková, CSc.

Sekce bakteriologie a mykologie – TBC, Synlab czech s.r.o., Praha

Tuberkulóza i mykobakterií jsou závažná infekční onemocnění, zejména u imunologicky oslabených pacientů a u pacientů s AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). Jejich včasná klinická i laboratorní diagnostika, včetně využití metody sloužící ke zjištění stavu imunity, významně přispívají k jejich správné léčbě. Pro mikrobiologickou diagnostiku jsou důležité správně odebrané biologické materiály a jejich správný a rychlý transport do laboratoře. Laboratorní diagnostika mykobakterií je možná klasickými mikrobiologickými metodami jako je mikroskopické a kulturační vyšetření, dále automatizovanými urychlenými kulturačními systémy a molekulárně biologickými metodami s pomocí kterých lze prokázat některá mykobakteria během několika hodin přímo v odebraném biologickém materiálu nebo provést identifikaci již narostlých mykobakterií. Cílem předložené práce je ukázat současné možnosti mikrobiologické a molekulárně biologické diagnostiky tuberkulózy a mykobakterií.

Klíčová slova: tuberkulóza, mykobakterií, mykobakterie, klasické laboratorní metody, molekulární biologické metody.

Current laboratory diagnostic possibility of tuberculosis and mycobacterioses

Tuberculosis and mycobacterioses are serious infectious diseases, especially in immunologically compromised patients and patients with AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). Their early clinical and laboratory diagnosis, including the use of the method used to determine the state of immunity contribute significantly to their proper treatment. For microbiological diagnosis is important to collect biological materials properly and to deliver them properly and quickly to the laboratory. Laboratory diagnosis of mycobacteria can be performed by classical microbiological methods such as microscopic and cultivation examination as well as by automated accelerated cultivation systems and by molecular biological methods by which can be proved some of mycobacteria within a few hours directly in the collected biological material or to identify already accrued mycobacteria. The objective of presented work is to present the current possibilities of microbiological and molecular biological diagnosis of tuberculosis and mycobacterioses.

Key words: tuberculosis, mycobacterioses, mycobacteria, classical laboratory methods, molecular biological methods.

Med. praxi 2011; 8(11): 466–468

Úvod

Tuberkulóza (TB) od dávných dob patří mezi nejrozšířenější infekční onemocnění na světě. Dle Světové zdravotnické organizace se odhaduje, že je v současnosti nakažena asi 1/3 veškeré populace, ročně přibývá asi 6–8 milionů nových případů a kolem 2–3 milionů lidí na celém světě na TB umírá (1). Původcem TB je *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tbc*), jehož objevitelem byl v r. 1882 Robert Koch a dále geneticky příbuzná mykobakteria *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum* a *M. microti*, která spolu s *M. tbc* jsou označovány jako komplex *M. tbc* (2, 3). TB současnosti je především velkým problémem u osob se sníženou imunitou a u pacientů s AIDS nejen v rozvojových, ale i ve vyspělých zemích. K jejímu šíření přispívá i migrace lidí, abúzus drog, alkoholu, podvýživa apod. Šíření původce zřejmě podporuje i jeho odolnost k zevním vlivům a malá infekční dávka, neboť k infikování neimunního jedince postačí jen několik málo bakterií (4). Zdrojem onemocnění je nejčastěji nemocný člověk. Přenos původce probíhá většinou respirační cestou, méně jiným způsobem. Po průniku do organismu, což je většinou do plic,

jsou mykobakteria prostřednictvím makrofágů zanesena do lymfatických uzlin plicního hilu (2, 4). Ve spolupráci makrofágů se specifickými lymfocyty (T i B) se rozvíjí buněčná imunitní odpověď, při které dochází k uvolnění mediátorů zánětu (interleukiny, interferon gama, tumor nekrotizující faktor a další) a aktivaci buněčné obranné reakce, jejímž výsledkem je tvorba specifických ložisek – granulomů (GR). Infikované ložisko a infikovaná spádová lymfatická uzlina jsou označovány jako primární komplex (2, 4). Odtud se mohou mykobakteria šířit lymfatickými cestami do dalších orgánů (meningy, urogenitální systém, klouby, kosti, kůže), kde vznikají GR sekundární. GR mohou ve svém centru znekrtovat a rozpadnout se, což je označováno jako kaseifikace nebo-li zesýrovatění (4). Mykobakteria v malých GR jsou zpravidla imunitní reakcí zničena, velké GR se opouzdří a posléze kalcifikují. Mykobakteria v jejich centru jsou pro imunitní buňky nepřístupná a v dominantní podobě přežívají v organismu po různě dlouhou dobu. Při oslabení imunity z různých příčin může dojít k reaktivaci nebo reinfekci onemocnění. Pokud se dostanou mykobakteria do krevního řečiště,

dochází k miliárnímu rozsevu, kdy se následně GR vytvoří prakticky ve všech orgánech a dochází ke generalizaci infekce (2, 12). Klinicky je zpravidla aktivní TB chronický proces, který může unikat pozornosti a na toto onemocnění by mělo být pomýšleno vždy při chronické únavě, subfebrilích, profúzních nočních potech, při hubnutí a při déletrvajícím kašli z počátku bez a později s produkcí sputa (4). U některých pacientů, zejména imunologicky oslabených, mohou plicní i mimoplicní onemocnění působit též podmíněně patogenní mykobakteria, která mohou vyvolávat onemocnění u zvířat nebo se nacházejí v zevním prostředí a jsou přenosná na člověka. Patří sem především komplex *M. avium-intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. gordonae* a řada dalších mykobakterií. Onemocnění vyvolaná těmito mykobakteriemi jsou nazývána mykobakterií (3). Neléčená či pozdě rozpoznaná TB i mykobakterií vedou ke smrti pacienta. Nezbytným předpokladem správné a účinné terapie je včasná diagnostika onemocnění a zahájení vhodné antituberkulózní terapie. Při podezření na TB musí být pa-

cient komplexně vyšetřen klinickým lékařem (důkladná anamnéza, rtg plic, biochemické, hematologické, případně histologické vyšetření), který na základě zjištěných obtíží ordinuje ve spolupráci s klinickým mikrobiologem laboratorní vyšetření k určení etiologického agens onemocnění (5).

Laboratorní diagnostika

Základem kvalitního mikrobiologického vyšetření je správný odběr vhodného biologického materiálu, pokud možno před nasazením antituberkulotické léčby a jeho správný transport do laboratoře, nejlépe v chladicích boxech (3). Při podezření na TB nebo mykobakteriózy jsou odebírány různé biologické materiály. U respiračních a plicních forem se nejčastěji odebírá sputum, případně indukované sputum, pokud možno před jídlem a hygienou dutiny ústní. Dále lze odebrat bronchoalveolární laváž, pleurální výpotek, méně často laryngální výtěr. Při podezření na meningitidu se odebírá mozkomíšní mok. Při suspekci na urogenitální TB střední proud moči, případně jiné materiály z urogenitálního traktu (prostatický sekret, ejakulát, menstruační krev) (3, 5). Žaludeční obsah je odebírán žaludeční sondou též nalačno a do laboratoře musí být transportován nejpozději do 4 h po odběru (pro neutralizaci vzorku). Stolice je odebírána do sterilních zkumavek. K mykobakteriologickému vyšetření lze zasílat výtěry a stěry z hnisavých procesů, ran, píštělí. K jejich odběru lze použít laryngeální sondy zvlhčené ve sterilní destilované vodě. Pevné kousky tkáně jsou vždy odebírány do sterilních zkumavek bez přidání konzervačních nebo fixačních prostředků. U materiálů, kde se předpokládá intermitentní vylučování mykobakterií (moč, sputum), je vhodné odebírat více vzorků v několika po sobě jdoucích dnech a ve větším množství. K odběru tekutých materiálů lze použít i injekčních stříkaček, které mohou zároveň sloužit k transportu (3). Pro odběry na mykobakteriologické vyšetření jsou naprosto nevhodné odběrové soupravy s transportními půdami. Krev se odebírá ke zjištění stavu buněčné imu-

nity pacienta (6, 7). Diagnostické laboratorní metody v mykobakteriologické laboratoři zahrnují klasické metody mikroskopického a kulturačního průkazu mykobakterií v biologickém materiálu a v posledních letech též jejich průkazu pomocí molekulárně biologických metod (MBM) (3, 10). Mikroskopické vyšetření umožňuje prokázat přítomnost acidorezistentních tyček (ART) přímo v odebraných materiálech v barvených mikroskopických preparátech (fluorescenční barvení, méně Ziehl-Neelsen) během několika málo hodin. Kulturační vyšetření na pevných i tekutých půdách umožňuje průkaz živých mykobakterií. Jejich generační doba je dlouhá, proto i kulturační vyšetření trvá dle typu mykobakterií až 6–9 týdnů. Metody urychlené kultivace založené na detekci metabolických produktů rostoucích mykobakterií v uzavřených systémech (BacT/ALERT) nebo na detekci spotřeby kyslíku v průběhu jejich růstu (Bactec), prokazují živá mykobakteria v kratší době než klasické kulturační vyšetření (8, 9). Jejich nevýhodou je, že na negativní výsledek je nutné počkat 6 týdnů. Moderní MBM, založené na detekci specifických úseků nukleových kyselin (NK) typických pro konkrétní mykobakteria, jsou rychlé metody průkazu, kdy řádově v rozmezí několika hodin lze prokázat jejich přítomnost (komplex *M. tbc*) přímo v odebraném biologickém materiálu. Jedná se o *Mycobacterium tuberculosis* Direct (MTD) testy nebo Polymerase Chain reaction (PCR) (tabulka 1). Tyto testy prokazují v případě pozitivitu specifické úseky NK, pomocí značených genetických sond, které jsou komplementární k hledanému úseku NK (3, 7). MBM lze detekovat genetický materiál nejen ze živých, ale i z neživých mikroorganismů, a proto je nutné vždy vyšetření doplnit kulturačním vyšetřením, které prokazuje živá mykobakteria, neboť jenom živá mykobakteria mohou vyvolat onemocnění (3, 5). Narostlé mikroorganismy jsou identifikovány MBM (genotypizace, sekvenční analýza), které umožňují určit species komplexu *M. tbc* a další netuberkulózní mykobakteria (NTM) (7). Bakteriologická identifikace hraje význam-

nou roli při stanovení etiologie onemocnění. Stejný diagnostický význam má i histologické vyšetření, kdy jsou ve vyšetřovaném vzorku prokázány buňky a změny typické pro specifický granulomatózní zánět (Langhansovy buňky, kaseózní nekróza), případně ART (5, 14). Součástí laboratorního vyšetření je stanovení citlivosti či rezistence mykobakterií na antituberkulotika (AT) první a druhé řady, dle potřeby i dalších AT. Stanovení citlivosti na AT se provádí u všech nových případů onemocnění TB, potvrzených bakteriologicky (komplex *M. tbc*), a u rezistentních kmenů. Kromě klasických metod lze multirezistentní kmeny *M. tbc* prokazovat molekulárními metodami, jejichž předností je rychlé získání výsledku, v rutinní praxi však zatím nejsou všude dostupné (10). U onemocnění vyvolaných NTM se testy citlivosti provádějí v souladu s doporučenými postupy pro terapii NTM a dle výsledku empirické léčby (15, 16).

Nepřímé diagnostické testy

Ke zjištění stavu buněčné imunity, kromě kožního tuberkulinového testu (Mantoux), jsou v posledních letech používány IGRA (Interferon Gamma Release Assay) testy, kterými lze prokázat z krve pacienta interferon gama (IFN-γ), produkováný specifickými lymfocyty, pokud přišly někdy do kontaktu s *M. tbc* (6, 11, 17). Tuberkulinovým testem je hodnocena kožní reakce pozdní přecitlivělosti po aplikaci PPD (proteinový purifikovaný derivát), připraveného z vybraných kmenů *M. tbc* (18). Po 72 h se měří průměr indurace, přičemž za pozitivní je považována indurace větší než 5 mm. Test může být pozitivní nejen po infekci *M. tbc*, ale též u osob očkováných BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) vakcínou (12, 17) nebo po infekci jinými mykobakteriemi, případně z neznámých důvodů. Kritériem pro rozlišení postvakcinační a postinfekční imunity je velikost indurace. Výsledek testu může být ovlivněn i způsobem aplikace i hodnocení (19). U osob se sníženou imunitou z nejrůznějších důvodů, včetně pacientů infikovaných HIV, může být test negativní (17). Nejznámější IGRA test je QuantiFERON®-TB Gold, který používá proteino-

Tabulka 1. Laboratorní metody pro diagnostiku tuberkulózy a mykobakterióz

Laboratorní metoda	Biologický materiál	Doba do získání výsledku	Hodnocení – průkaz
Mikroskopický preparát	všechny materiály moč, krev, menstruační krev, stolice na vyžádání	2 h	acidorezistentní tyčky
Kulturační vyšetření	všechny materiály	2–9 týdnů	živá mykobakteria
Urychlená kultivace BacT/ALERT, Bactec	všechny materiály	několik dnů – 6 týdnů	živá mykobakteria
MTD, PCR	všechny materiály – u některých textů kromě krve	6–8 hodin	genetický materiál specifický pro <i>M. tbc</i> komplex
QuantiFERON	krev do tří speciálních zkumavek	24 h	interferon gama (IF N-Y) stav buněčné imunity

vě antigeny, specifické pouze pro *M. tuberculosis* a přítomné též u *M. kansasii*, *M. marinum* a *M. szulgai*. U ostatních mykobakterií, včetně *M. bovis* BCG tyto antigeny přítomny nejsou. Metoda významně přispívá k diagnostice latentní TB, pozitivní výsledek je však i u aktivní TB. Test jejich rozlišení neumožňuje. Negativní výsledek neznamená, že pacient nemůže mít TB (17).

Závěr

Laboratorní diagnostika TB i mykobakterióz je důležitou součástí všech dalších diagnostických metod (histologických, zobrazovacích, biochemických, hematologických a klinických), jejichž výsledkem je správná diagnosa těchto závažných onemocnění (5, 14). Význam MBM pro rychlou diagnostiku TB, multirezistentní TB i mykobakterióz je nesporný.

Literatura

1. Hanuš T, Kolombo I, Poršová M, et al. Infekce močových cest specifického, parazitárního a mykotického původu. In: Kolombo I, Hanuš T, Porš J, et al. Infekce močových cest pro praktické lékaře a specialisty s. 145–163. Nakladatelství Galén, Praha 2007: ISBN 978-80-7262-445-8.
2. Votava, a kol. Lékařská mikrobiologie speciální, s. 159–168, vydavatelství Neptun, Brno 2003: ISBN 80-902896-6-5.
3. Kolektiv autorů. Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí. Vydala Národní referenční laboratoř pro mykobakterie, SZÚ Praha ve spolupráci s firmou Trios, s. r. o. s. 9–27, Praha říjen 1998.

4. Julák J. Úvod do lékařské bakteriologie, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha 2006: 333–344, ISBN 80-246-1270-4.
5. Ptáková M, Klamo J, Dvořáček J. Problematika diagnostiky urogenitální tuberkulózy ve vztahu k legislativě Urologie pro praxi 2003; 2: 66–68.
6. Bártů V, Havelková M, Kopecká E. QuantiFERON®-TB Gold in the Diagnosis of Active Tuberculosis, J. Int. Med. Res., 2008; 36(3): 434–437.
7. Sang-Nae Cho. Current Issues on Molecular and Immunological Diagnosis of Tuberculosis Yonsei Med. J. 2007 June 30; 48(3): 347–359.
8. Crump JA, Morrissey AB, Ramadhani HO, et al. Controlled comparison of BacT/Alert MB system, manual Myco/F lytic procedure, and isolator 10 system for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Bacteremia. J. Clin. Microbiol. 2011; 49(8): 3054–3057.
9. Rodrigues C, Shenai S, Sadani M, et al. Evaluation of the bactec MGIT 960 TB system for recovery and identification of Mycobacterium tuberculosis complex in a high throughput tertiary care centre. Indian. J. Med. Microbiol. 2009; 27(3): 217–221.
10. Laurenzo D, Mousa SA. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis and current status of rapid molecular diagnostic testing. Acta. Trop. 2011; 119(1): 5–10.
11. Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2010; 28(4): 245–252.
12. Trnka L, Wallenfels J. Jak pokračovat v dalším zdolávání tuberkulóz u nás? Čas. Lék. čes., 2007; 146(4): 351–355.

Internetové zdroje

13. Wikipedia-tuberkulóza [online]: [cit.7.9.2011]. Dostupné na <http://cs.wikipedia.org/wiki/Tuberkul%C3%B3za#Prevalence>.
14. Bártl V. Tuberkulóza – současný stav, Postgraduální medicína 7.6.2011, ZDN [online]: [cit.10.9.2011]. Dostupné na: <http://www.zdn.cz/clanek/postgraduální-medicína/tuberkulóza-soucasny-stav-460138>.

15. Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu netuberkulózních mykobakterií dospělých [online]: [cit.24.9.2011]. Dostupné na: <<http://www.pneumologie.cz/odborne/doc/Doporu%C4%99en%C3%BDpostup%20pro%20diagnostiku%20lecbu%20mykobakteri%C3%BDdospel%C3%BDch%20-201.doc>>.
16. Arend SM, van Soelingen D, Ottenhoff THM. Diagnostika a léčba plicních netuberkulózních mykobakteriálních infekcí, In: Curr. Opin. Pulm. Med. 2009; 6: 56–63. [online]: [cit.24.9.2011]. Dostupné na: <<http://www.prolekare.cz/copy-clanek?id=30785>>.
17. QuantIFERON- TB® Gold: [online]: [cit.7.9.2011]. Dostupné na: <<http://www.cellestis.com/IRM/content/pdf/CZ%20Czech%20QFT%20insert%20ver%20G.pdf>>.
18. Tuberkulin PPD RT 23 SSI, příbalová informace – informace pro uživatele [online]: [cit.24.9.2011]. Dostupné na: <<http://www.sukl.cz/download/pil/P1108294.doc>>.
19. Potrepčáková S, Skříčková J. Tuberkulóza, Practicus 4/2008: 24–29, [online]: [cit.24.9.2011]. Dostupné naS: <<http://web.practicus.eu/Documents/Practicus-04-2008/24-tuberkuloza.pdf>>.

Článek přijat redakcí: 10. 10. 2011
Článek přijat k publikaci: 24. 10. 2011

MUDr. Miluška Ptáková, CSc.

*Sekce bakteriologie a mykologie – TBC
Synlab czech s.r.o.
U Vojenské nemocnice 1 200,
169 00 Praha 6*

