



# ZPRAVODAJ

CENTRA KLINICKÝCH LABORATOŘÍ

Vážené kolegyně, Vážení kolegové, milí přátelé,

děkuji Vám za velmi dobrou spolupráci v letošním roce a zároveň Vám i Vaším blízkým přeji krásné Vánoce a do roku 2013 pak hlavně pevné zdraví, pracovní i osobní úspěchy, radost, optimismus.

Věřím, že se naše spolupráce bude i nadále rozvíjet a že přispějeme k Vaší spokojenosti.



RNDr. Petr Hapala,  
ředitel Zdravotního ústavu Ostrava

## Obsah

<b>Význam preanalytické fáze pro kvalitní výsledky vyšetření</b>	<b>3</b>
<b>Co lze očekávat od imunoanalytických testů a jak interpretovat jejich výsledky</b>	<b>4</b>
<b>Interpretace výsledků laboratorního imunologického vyšetření v praxi.</b>	<b>6</b>
<b>Úskalí laboratorní diagnostiky průšnic</b>	<b>7</b>
<b>Diagnostika larvální toxokarózy</b>	<b>10</b>
<b>Interpretace kvantitativních výsledků získaných metodou real-time PCR</b>	<b>12</b>
<b>Interpretace serologických metod v klinické mykologii</b>	<b>14</b>
<b>Využití molekulárně biologických metod pro identifikaci méně obvyklých druhů mykobakterií a detekci lékové rezistence M. tuberculosis. (uplatnění metod a interpretace výsledků)</b>	<b>16</b>
<b>Možnosti diagnostiky chlamydiových infekcí</b>	<b>20</b>
<b>4. pracovní konference zdravotních laborantů a zdravotních sester</b>	<b>21</b>
<b>Rozpis služeb v době vánočních svátků</b>	<b>23</b>

## Význam preanalytické fáze pro kvalitní výsledky vyšetření

Alexandra Lochmanová

Laboratorní vyšetření slouží především k diagnostickým účelům, ale svůj význam mají také při monitorování průběhu nemoci, určování prognózy onemocnění a při preventivních screeningových programech. Proces, kterým vyšetřovaný vzorek prochází, můžeme rozdělit na fázi (i) preanalytickou, (ii) analytickou a (iii) postanalytickou. Preanalytická fáze se významně podílí na správnosti laboratorního vyšetření a až 60% chyb při laboratorním vyšetření vzniká v této fázi.

Preanalytická fáze zahrnuje odběr, přípravu a zpracování biologického vzorku před zahájením vlastního laboratorního vyšetření. Stabilita různých analytů je velmi různorodá, záleží na tom, zda primární vzorek tvoří plná krev, nebo krevní sérum, resp. plazma. K obecným zásadám při odběru patří přesná a jednoznačná identifikace biologického materiálu, stejně tak jako znalost charakteristiky vyšetřovaného analytu, jako je biologický poločas, rychlost stimulace nebo degradace. Zásadní roli hraje způsob odběru v závislosti na typu biologického materiálu (stabilizační a protisrážlivá činidla), stálé a proměnné vlivy působící na biologické vzorky a v neposlední řadě i uchování a transport biologického vzorku.

Zejména oblast diagnostiky alergií a imunopatologických stavů zahrnuje řadu laboratorních testů extrémně závislých na správné preanalytické fázi. Jedná se především o biologické testy, resp. buněčné testy prováděné *in vitro*, při kterých je sledována biologická odezva buněk pacienta. Ale i některé testy z oblasti humorální imunity (např. stanovování aktivity komplementového systému, koncentrace ECP, tryptázy) vyžadují, aby se sražená krev dostala do laboratoře co nejdříve a sérum bylo uchováváno do vlastního provedení analýzy zamražené při odpovídající teplotě.

Nejčastější chyby preanalytické fáze se týkají odběru materiálu. Při odběru materiálu je třeba mít na mysli způsob odběru v závislosti na typu biologického materiálu, mít správný odběrový materiál (odlišná stabilizační nebo protisrážlivá činidla) a postupovat odpovídající technikou. Při odběru více zkumavek z jednoho vpichu je potřeba zachovat doporučené pořadí odběru:

- zkumavky pro hemokultivaci
- zkumavky bez přísad
- zkumavky s přísadami

Odběr plné krve je kromě imunoanalytických a sérologických vyšetření prováděn i pro stanovení základních buněčných populací periferní krve včetně jejich funkční aktivity. Nezbytným doplňkem tohoto vyšetření je vyšetření krevního obrazu. V tomto případě je nutno odebrat krev nesrážlivou, přičemž velkou pozornost je nutné věnovat výběru vhodného protisrážlivého činidla a zachování dodržení poměru mezi krví a protisrážlivým činidlem. Mezi běžně používaná antikoagulantia patří heparin, EDTA, citrát sodný

a oxaláty. Citrát sodný a oxaláty jsou využívány především v biochemii, jako antikoagulantia používaná pro odběr na testy buněčné imunity jsou nevhodná.

Princip antikoagulačních účinků EDTA (chelaton 2, kyselina ethylendiamintetraoctová) spočívá ve vazbě s vápníkem přítomným v krvi, čímž se zabrání zahájení koagulační kaskády. Toto antikoagulant je používán pro vyšetření krevního obrazu a povrchových buněčných znaků v průtokové cytometrii protože zachovává původní velikost a tvar buněk. Na druhé straně vápník patří k nejvýznamnějším intracelulárním iontům, které se podílejí na buněčné aktivaci a metabolismu buňky a tudíž použití EDTA jako antikoagulant v případě funkčních testů je naprosto nevhodné a v tomto případě je nutno použít heparin. K zachování dodržení optimálního poměru mezi krví a protisrážlivým činidlem je v případě použití uzavřených odběrových systémů nutno dodržet výrobcem uvedené množství odebraného materiálu, resp. krve.

Transport materiálu má být šetrný a rychlý, při adekvátní teplotě, přičemž zásadní je seznámení se s podmínkami transportu a skladování biologického materiálu pro požadované vyšetření. Laboratoř upřednostňuje primární vzorky, tzn. vzorky odebrané do originálních odběrových zkumavek a/nebo souprav bez předchozího přerozdělování v jiných laboratořích.

Oddělení imunologie a alergologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě provádí jak základní, tak vysoce specializovaná vyšetření jak humorální, tak buněčné imunity. V případě humorální imunity je kladen důraz zejména na odpovídající množství biologického materiálu požadovanému počtu vyšetření. Z hlediska požadované doby od odběru do doručení materiálu do laboratoře je bezpodmínečně nutné doručit materiál nejen tentýž den, ale i v určeném časovém intervalu pro vyšetření buněčné imunity (povrchové znaky leukocytů, stanovení HLA-B27, HLA-B7, fagocytóza, lymfocytární proliferace) a pro vybrané testy humorální imunity (viz výše). Vzhledem k tomu, že některá specializovaná vyšetření buněčné imunity není možno z technických důvodů provádět každý den (test lymfocytární proliferace, test aktivity basofilů) je možno nalézt obecné pokyny pro tyto odběry na laboratorní žádance, v laboratorní příručce nebo se informovat přímo telefonickým dotazem.

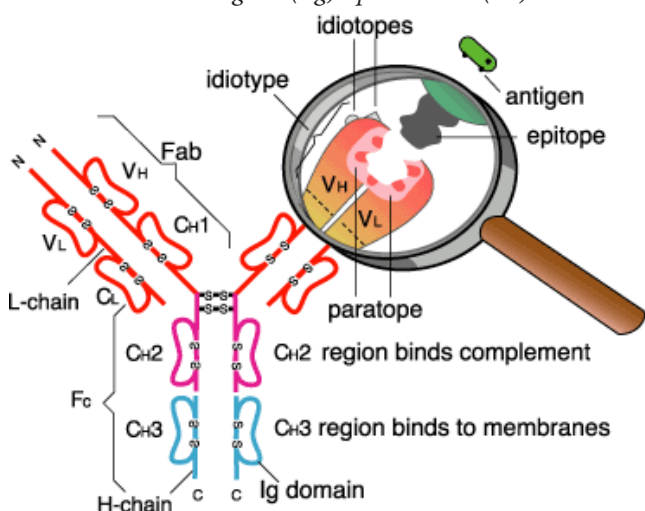
## Co lze očekávat od imunoanalytických testů a jak interpretovat jejich výsledky

Ivo Lochman

Imunoanalytické metody jsou laboratorní metody založené na reakci antigenů s protilátkami. Jsou dnes široce aplikovány nejen v klinických laboratořích, ale v laboratořích nejrůznějšího typu, všude tam, kde metodika využívá alespoň jako jeden analyt protilátku. Jejich popularita je dána tím, že jde, co se týče provedení, o metody poměrně jednoduché a že stále přežívá paradigma, že reakce antigenu s protilátkou je přísně specifická, aniž by byl pojem specifčnosti blíže definován. Opomíjí se fakt, že interakce antigenů s protilátkami mají různou intenzitu související s afinitou, resp. afinitou protilátek. Platí sice, že protilátky, které se podílejí v rámci plnění úlohy imunitního systému, tj. podílet se spolu se systémem nervovým a endokrinním na udržování homeostázy organismu a nejen na zajišťování jeho „specifické“ humorální obranné funkce, pomáhají také jako informační nástroje zajišťovat a zvyšovat specifčnost celé imunitní odpovědi a tím i její efektivitu. Skutečnost, že fungování imunitního systému (IS) a jeho nástrojů včetně protilátek není založeno na přísné specifčnosti, se při tom přehlíží. Z pohledu imunitního systému by ani fungování založené na přísné specifčnosti nebylo výhodné, poněvadž přes obrovský potenciál flexibility tvorby protilátek a receptorových struktur, které IS využívá, by při aplikaci přísné specifčnosti interakce antigenů s protilátkami nebyl IS schopen reagovat na všechny antigeny, se kterými se organismus během života setká. Výsledná reakce IS na jakýkoliv podnět je tedy založena na vyhodnocování celé řady signálů v daném prostoru a čase a IS vyhodnocuje nejen jejich kvalitu, čili zda je signál přítomen, ale i kvantitu (jaká je jeho síla, jaká je koncentrace, resp. množství antigenu v daném prostoru a čase) a dobu, ve které a po kterou signál působí. Získané informace tedy nemohou vést obec-

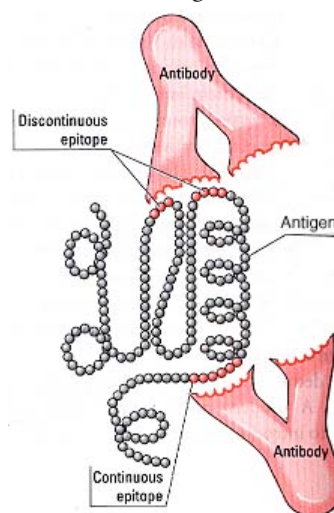
ně při vyhodnocování k jednoznačným závěrům. Proto logika, na které je fungování IS založeno, nemůže být a také není kategoriální (booleánovská), ale je pravděpodobnostní („fuzzy“). Podobně je nutno nahlížet i na interakce antigenů a protilátek v souvislosti s jejich aviditou, tj. intenzitou, silou jejich interakce s antigeny. To vše znamená, že reakce a odpověď IS na daný signál je u každého jedince v dané situaci a s ohledem na všechny okolnosti správná, optimální a adekvátní vždy jen s určitou pravděpodobností. Tato pravděpodobnost je ovšem u správně fungujícího IS velmi vysoká. Vše výše řečené se odráží i na laboratorních metodách, které využívají nástroje IS a mezi které patří i imunoanalytické metody. Musíme s i uvědomit, že představa interakce antigenu s protilátkou formou zámku a klíče (obr. 1) je sice velmi ilustrativní z didaktického hlediska, ale neodpovídá realitě. Zatímco protilátky a jejich vazebná místa pro antigeny mají z velké části jasně definovanou strukturu a lze předpokládat, že v přesně definovaném prostředí má také jejich vazebné místo pro antigen i stejný tvar, je struktura antigenů velmi rozdílná. U lineárních antigenů musíme akceptovat, že se tyto antigeny nenacházejí v přirozeném prostředí jako natažené provázky z řadou epitopů (vazebných míst pro protilátky) lineárně seřazených na tomto „provázku“, ale jsou různě pokroucené a imunitnímu systému reálně nabízené epitopy mohou představovat v reálu in vivo struktury na „provázku“ od sebe velmi vzdálené (obr.2). Tvar „provázku“ použitý v konkrétní imunoanalytické metodě nabízený protilátkám ve vyšetřovaném vzorku se může ve své formě velmi lišit od formy, proti které byly IS protilátky vytvořeny v reálném prostředí in vivo. Platí to např. pro F-aktin, protilátky proti kterému se využívají v diagnostice některých autoimunit-

Obr.1.: Interakce antigenu (Ag) s protilátkou (Ab)



Představa interakce formou zámku a klíče. Do žlábků vazebného místa přesně zapadá příslušný epitop daného antigenu. Intenzita interakce jednoho vazebného místa protilátky a antigenu se nazývá afinita protilátky. Celková průměrná síla interakcí vazebných míst všech protilátek ve vyšetřovaném vzorku s molekulami antigenu v daném prostředí se nazývá avidita protilátek.

Obr.2.: Interakce lineárního Ag s Ab

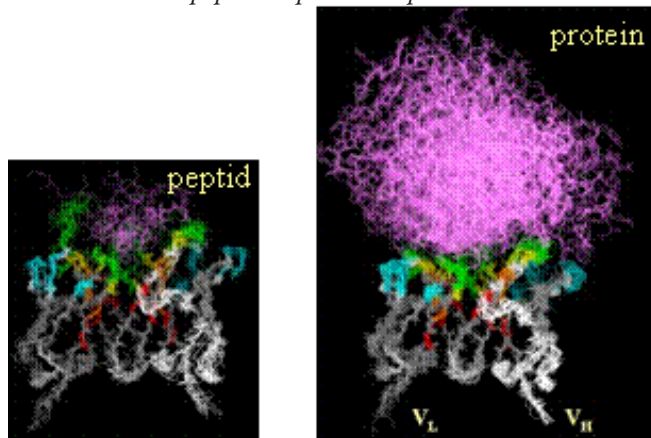


Protilátkám jsou nabízeny in vivo spojitě i nesouvislé antigenní struktury. Takovéto struktury by měly být nabízeny i v imunoanalytických testech

ních onemocnění (autoimunitní hepatitidy, celiakie), který má velmi dlouhou lineární molekulu. V ELISA, imunoblotovacích technikách a ALBIA, které se používají pro jejich stanovení, nelze použít jako cílovou strukturu (antigen), na níž se mají vyvazovat in vivo vytvářené protilátky proti F-aktinu, celou jeho molekulu, ale musí být použity jen její vybrané fragmenty (epitopy). I v metodách nepřímé imuno-fluorescence může fixace substrátu pro detekci anti-aktinových protilátek nebo protilátek, jejichž součástí F-aktin je (SMA), velmi ovlivnit citlivost metody.

Nejreálnější představa interakce antigenů s protilátkami je tedy představa interakce povrchů dvou měňavkovitě se měnících chuchvalců, které k sobě mají určitou afinitu (obr. 3). Je-li antigenů „chuchvalec“ veliký, např. tyroglobulin, lze si představit, že v daném reálném in vivo prostředí mohou být IS nabízeny různé epitopy, které nemusí být totožné s epitopy nabízenými protilátkám ve vyšetřovaném vzorku v konkrétní imunoanalytické metodě. Tyroglobulin je totiž protein o m.v. 670 kDa tvořený dvěma polypeptidickými řetězci sestávajícími se přibližně z 2768 aminokyselin a představuje 40 antigenních epitopů, z nichž jen 4-6 je rozpoznáváno B-lymfocyty a tvoří se pro něj protilátky.

Obr. 3: Interakce peptidu a proteinu s protilátkou



Žijeme v době komercializace. Všichni výrobci si své výrobky patentově chrání, a tak není možné tvrdit, že jejich diagnostika jsou totožná, přestože používají stejnou terminologii k jejich popisu a jsou určeny ke stejným účelům. Musíme přijmout fakt, že s diagnostiky různých výrobců budeme dostávat u určitého procenta vzorků rozdílné výsledky. Stejně tak výrobci deklarovaná klinická senzitivita a specifita jejich konkrétních diagnostik není mezi výrobky různých firem exaktně srovnatelná a ověřitelná, neboť vzorky souborů pacientů a kontrolních skupin jedinců, na nichž byly tyto statistické charakteristiky stanoveny, nejsou ostatním k dispozici. Musíme si také uvědomit, jak jsou klinická senzitivita a specifita deklarovány (obr.4) a že při definici těchto pojmů velmi závisí na prevalenci daného onemocnění v konkrétní oblasti. Většinou také chybí podrobnější údaje, jak jsou u výrobcem použitých vzorků pro stanovení klinické senzitivity a specifity diagnostika definovány patientský soubor a kontrolní soubor „zdravých“ jedinců. A chceme skutečně testovat a zjišťovat, zda se výsledek našeho pacienta v daném testu liší od normy udávané pro dané tento test pro

zdravé jedince? Nebo chceme zjistit, zda nález u našeho pacienta nebo pacienta s námi předpokládanou diagnózou liší od výsledku pacientů, kteří mají stejné symptomy onemocnění, ale jinou diagnózu?

Obr. 4: Definice klasifikačních pojmů

### Incidence

Frekvence výskytu onemocnění v časovém úseku

### Prevalence

Podíl populace trpící onemocněním v daném časovém období

### Positivní předpovědní hodnota

Podíl skutečně pozitivních výsledků testů mezi všemi pozitivními výsledky testů

### Senzitivita

Podíl pozitivních výsledků mezi nemocnými pacienty

### Negativní předpovědní hodnota

Podíl skutečně negativních výsledků testů mezi všemi negativními výsledky testů

### Specifita

Podíl negativních výsledků testů mezi zdravými

### Efektivita

Relativní počet správně klasifikovaných pacientů

definice	výsledky testu	
	+	-
onemocnění	A	B
bez onemocnění	C	D

$$\frac{A}{A + C}$$

$$\frac{A}{A + B}$$

$$\frac{D}{B + D}$$

$$\frac{D}{C + D}$$

$$\frac{A + D}{A + B + C + D}$$

$$\frac{A + D}{A + B + C + D}$$

$$\frac{A + D}{A + B + C + D}$$

$$\frac{A + D}{A + B + C + D}$$

$$\frac{A + D}{A + B + C + D}$$

$$\frac{A + D}{A + B + C + D}$$

Abychom se vyhnuli uvažování v pravděpodobnostní, nepohodlné logice, vymyslíme si různé kategoriální termíny, jejichž hranice pak jen těžko obhajujeme. Např. protilátky dělíme na přirozené (s nižší aviditou) a obranné (s vyšší aviditou), na protilátky monoreaktivní (reagující jen s jedním antigenem) a polyreaktivní (reagující s více antigeny) apod. Při tom pojem monoreaktivní je jen fiktivní a říká jen, že při našem testování jsme neměli žádný antigen, se kterými by testovaná protilátka reagovala s potřebnou aviditou, abychom mohli reakci hodnotit jako pozitivní. Musíme se uvědomit, že v praxi vždy testujeme při stanovování protilátkové odpovědi tzv. polyklonální protilátky, tj. směs protilátek s vyšší a nižší aviditou k danému antigenu produkovanou různými klony buněk. Používání uměle vyprodukovaných monoklonálních protilátek podobně jako rekombinantních antigenů přispělo sice významně ke standardizaci imunoanalytických systémů, ale z hlediska klinické efektivity používaných laboratorních testů není jejich přínos tak významný.

Z výše uvedeného vyplývá, že si postupně musíme zvykat na skutečnost, že imunoanalytické metody, a to nejen v imunologické či mikrobiologické diagnostice, ale např. i v oblasti diagnostiky hormonů, nádorových markerů apod. nelze dnes ještě standardizovat. To ale neznamená, že bychom je neměli využívat a že by pro laboratorní diagnostiku ztráceli význam. Musíme pouze respektovat skutečnost, kterou poprvé oficiálně přiznaly ACAAI, AAAAI a CLSI ve svých dokumentech z r. 2008 pro diagnostiku sp.IgE, kde se konstatuje:

- stanovování sp.IgE dnes nelze ještě standardizovat
- není dostupný žádný mezinárodní referenční standard, který by dovozoval srovnání s nějakou cílovou hodnotou
- při stanovování sp.IgE existuje řada interferencí:
  - lidský RF, přirozeně se nacházející a terapeuticky aplikované anti-IgE protilátky a lidské anti-alergeno-

vé IgG protilátky přítomné ve vyšetřovaném vzorku - zkříženě reagující cukerné složky (CCDs) mohou způsobovat pozitivní IgE výsledky nejasného významu

- proto klinikovi musí být vždy známa a laboratoři vždy uváděna metoda, kterou bylo sp.IgE stanovováno
- žádný z testů na stanovování spec.IgE neposkytuje absolutní průkaz přítomnosti nebo nepřítomnosti alergického onemocnění
- **jestliže diagnostický test nesouhlasí s anamnézou, opakuj ho, resp. použij jiný**

Analogicky lze aplikovat tyto závěry pro imunoanalytické techniky ve všech oblastech. U většiny imunoanalytických metod, včetně dlouhodobě a rutinně využívaných, jako je např. dg RF, se musíme smířit se skutečností, že až 10% vzorků vyšetřovaných diagnostiky různých výrobců může poskytovat rozdílné výsledky.

#### Literatura u autora.

## Interpretace výsledků laboratorního imunologického vyšetření v praxi.

Vítězslav Novák

Podle definice ČSAKI ( České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii) je alergologie a klinická imunologie interdisciplinárním oborem s klinickou i laboratorní složkou. Zabývá se studiem, diagnostikou, léčbou a prevencí pacientů s nemocemi vyvolanými poruchami imunitních mechanismů nebo patologickými stavy, na jejichž vzniku, průběhu a prognóze se imunologické mechanismy významně podílejí. Jsou to stavy, kdy imunomodulace tvoří důležitou část terapie a prevence. Nedílnou součástí oboru je specializovaná laboratorní diagnostika. Laboratorní imunologické vyšetření dává odpověď na některé otázky diagnostické, prognostické a napomáhá při monitorování aktivity onemocnění, respektive účinnosti nasazené terapie.

Imunologická diagnostika oproti ostatním medicínským disciplínám daleko více využívá laboratorní metody na úkor jiných diagnostických postupů, např. endoskopie, zobrazovacích metod nebo funkčních testů. Paleta dostupných laboratorních vyšetření v imunologii je nesmírně široká a interpretace jejich výsledků může být dosti složitá.

Lékař většinou dostane z laboratoře výsledek v podobě nějaké číselné hodnoty s určitými jednotkami, ve kterých je výsledek vyjádřen. Dále bývá přiřazeno referenční rozmezí normálních hodnot. Aby byl laboratorní nález vůbec v praxi použitelný, je nutno si zodpovědět řadu otázek. V prvé řadě bychom měli uvážit, do jaké míry může odpovídat uváděný výsledek vyšetření skutečné reálné hodnotě vyšetřovaného analytu. V úvahu musíme brát parametry jako je nejistota měření, chyba měření (náhodná i systematická, absolutní i relativní), svou roli hraje i analytická specifická a robustnost použité laboratorní metody.

Dále je nutné vyhodnotit, v jakém vztahu je uvedený laboratorní výsledek k deklarovanému normálnímu referenčnímu rozmezí a jaká je možnost porovnání aktuálního výsledku s dřívějšími nálezy v dokumentaci nebo jaká je vzájemná korelace výsledků mezi různými laboratořemi. Souhrnem je

možno konstatovat, že skutečná (pravá) hodnota jakékoliv měřené veličiny je hodnota ideální a v praxi nepoznatelná, a její vztah k referenčním mezím ve značné míře závisí na nejistotě a chybě měření a částečně často i na samotné metodice stanovení těchto referenčních hodnot. Výsledky vyšetření stejného analytu různými metodami a různými laboratořemi vzájemně korelují pouze statisticky a v konkrétních případech se mohou značně lišit. To vše je nutno mít na paměti při hodnocení každého jednotlivého výsledku.

Zcela zásadní význam pro indikaci určitého laboratorního vyšetření a následnou interpretaci výsledku má znalost výpovědní hodnoty požadovaného laboratorního vyšetření pro konkrétní řešenou problematiku. Částečně o tom vypovídá specifická a senzitivita použitého laboratorního testu. Různá laboratorní vyšetření je možno sdružovat do panelů specifických pro určitou skupinu chorob a takové panely jsou stále častěji nabízeny přímo výrobcem. Rozsáhlejší panely se hodí zejména pro primární diagnostiku, pro další sledování je využíváno užší spektrum cíleně volitelných parametrů nebo i marker jediný. Znalost dynamiky vyšetřovaného parametru v průběhu onemocnění a změny v souvislosti s léčbou umožní racionálně indikovat interval laboratorních kontrol. Obecně platí, že v imunologii nemáme k dispozici žádné laboratorní vyšetření, které by samo o sobě postačovalo k potvrzení nebo vyloučení předpokládané diagnózy a výsledky laboratorních vyšetření jsou v uváděných diagnostických kritériích jednotlivých onemocnění v drtivé většině minoritní. Vhodnou a smysluplnou kombinací použitých testů je sice možno značně zvýšit výpovědní hodnotu celého laboratorního imunologického vyšetření, to ale i tak zůstane pouze jednou ze součástí komplexního klinického pohledu na pacienta.

## Úskalí laboratorní diagnostiky příušnic

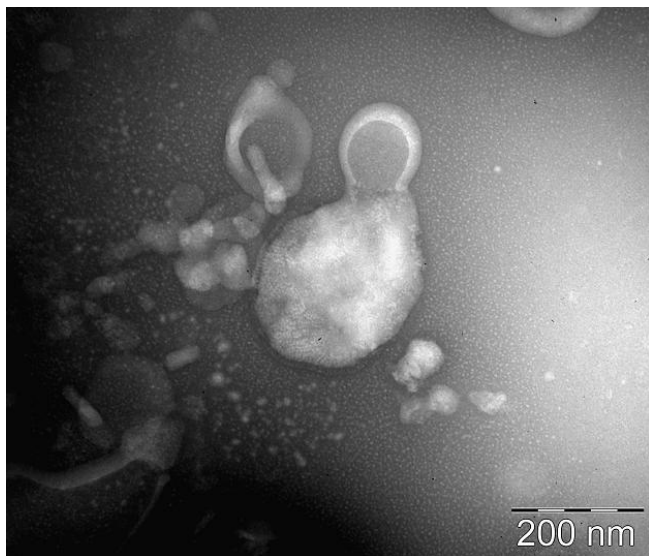
Hana Zelená, Markéta Pomiklová, Ivana Vidličková

### Úvod

Příušnice (parotitis epidemica, mumps) byly detailně popsány Hippokratem již v 5. století před Kristem. Francouzský lékař Guillaume de Baillou v 16. století předpokládal jejich infekční původ, když ve svém spisu popsal průběh epidemie příušnic v Paříži. Virový původ příušnic byl však prokázán až v roce 1934, kdy se dvojici amerických lékařů C. D. Johnsonovi a E.W. Goodpastureovi podařilo experimentálně přenést infekční filtrabilní agens ze slin nemocného člověka na opici. V roce 1945 poprvé izoloval virus příušnic na kuřecích embryích americký virolog Karl Habel.

Virus příušnic je taxonomicky zařazen do čeledi *Paramyxoviridae*, v rámci této čeledi společně s viry parainfluenzy 2 a 4 a s virem pseudotumoru drůbeže tvoří rod *Rubulavirus*. Nositelem genetické informace viru příušnic je jednovláknitá nesegmentovaná RNA s negativní polaritou. Morfologicky se jedná o pleomorfní neobalený virus o velikosti 85 až 300 nm [Obr. 1].

Obr. 1. Virus příušnic, kultivace na MDCK, transmisní elektronová mikroskopie, negativní barvení, 200 000x, H. Zelená



Mezi hlavní antigenní struktury virového obalu patří molekuly HN (hemagglutinin a neuraminidáza), které jsou hlavním nástrojem adsorpce a jsou cílem neutralizačních protilátek. Dalším obalovým proteinem je fúzní protein F zodpovědný za penetraci do buňky a malý hydrofobní protein SH, jehož funkce je nejasná. Matrixový protein M umístěný pod obalem se uplatňuje při kompletaci nových virionů. Nukleokapsidu tvoří nukleoprotein NP, RNA-polymeráza L a fosfoprotein P.

Virus parotitidy aglutinuje červené krvinky díky přítomnosti molekuly HN. Lze jej kultivovat in vitro na kuřecím embryu nebo na buněčných liniích Vero, CV-1, HeLa, MDCK. Při pomnožení na buněčných kulturách je patrný cytopatický efekt (CPE), přítomnost viru lze prokázat pomocí hemaglutinace nebo hemadsorpce.

### Klinické projevy

Jediným přirozeným hostitelem viru je člověk. Onemocnění se vyskytuje na celém světě. V nevakcinované populaci nejčastěji onemocní děti ve věku 5-9 let, v mírném podnebí se nejvíce případů objevuje v zimě a na jaře. Jedná se o kapénkovou infekci s inkubační dobou mezi 14-25 dny (nejčastěji 16-18 dní). Po vstupu do dýchacích cest se virus replikuje ve sliznici nosohltanu a v regionálních mízních uzlinách. Přibližně za 12-25 dní po expozici se objevuje virémie, během níž se virus šíří do tkání, zejména do slinných žláz, pankreatu, CNS, gonád nebo mléčné žlázy. Virus je vylučován slinami a močí po dobu 5-7 dní. Nemocný může být infekční již od 7. dne před klinickou manifestací až do 4. až 9. dne po začátku onemocnění.

V 20-25% má nákaza asymptomatický průběh, ve 40-50% probíhá necharakteristicky jako katar horních cest dýchacích se subfebriliemi nebo s jinými nespecifickými příznaky. Pouze ve 30-40% probíhá pod obrazem typických příušnic.

Příušnice se mohou ze začátku manifestovat nespecifickými příznaky, kterými jsou bolest hlavy, svalů, subfebrilie, katar horních cest dýchacích, nevolnost, nechutenství. Později se objeví tlak nebo tupá bolest v oblasti příušní žlázy, která je následována jejím bolestivým otokem jednostranným či oboustranným. Méně často bývají zasaženy podčelistní nebo podjazykové slinné žlázy. Současně bývá patrné zduření a zarudnutí Stenonova ústí. Otok dosahuje svého maxima do 48 hodin a poté postupně odeznívá do 7-10 dní.

Příušnice mohou být doprovázeny **komplikacemi**. Nejčastější je aseptická meningitida, která je asymptomatická až u 60% nemocných, symptomatická bývá u 10-15% pacientů s příušnicemi. Parotitická meningitida je častější u dospělých než u dětí a přibližně 3x častější u mužů než u žen. Její průběh bývá lehký. U 20-30% procent postpubertálních mužů jsou příušnice komplikovány orchitidou, která zpravidla nevede ke snížení fertility. Oooforitida se objevuje u 5% postpubertálních žen, klinicky může imitovat apendicitidu, neovlivňuje plodnost. Pankreatitida bývá u 2-5% pacientů. Mezi vzácnější komplikace patří mastitida, thyreoiditida, encefalitida, myelitida, akutní zánětlivá demyelinizační polyneuropatie Guillain-Barré nebo infekce vnitřního ucha, která vede k ireverzibilní hluchotě.

### Diferenciální diagnostika

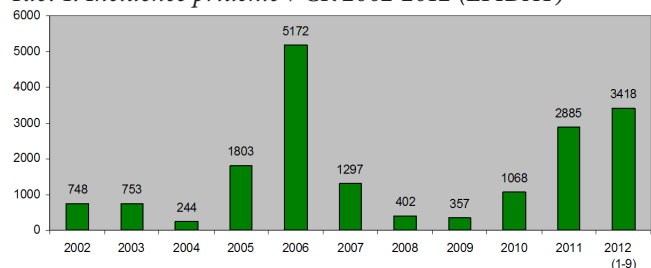
Klinické projevy podobné příušnicím mohou mít některé další virové infekce, např. EBV, CMV, HHV-6, adenoviry, enteroviry, parvoviry. Výrazným bolestivým otokem se projevuje rovněž bakteriální zánět slinné žlázy, jejímž nejčastějším původcem je *Staphylococcus aureus*. Rovněž sialolitíáza může imitovat příušnice. Dále je nutno vyloučit možnost tumoru příušní žlázy, případně některých vzácnějších onemocnění, jako je sarkoidóza (Heerfordtův syndrom).

### Incidence příušnic v ČR a očkování

V době před zavedením očkování se počet případů příušnic v bývalém Československu pohyboval okolo 50 až 80 tisíc

ročně. V roce 1987 bylo zahájeno plošné očkování živou bivalentní vakcínou Mopovac (spalničky+příušnice), od roku 1995 se očkuje trivalentní živou vakcínou (+ zarděnky) – Trivivac, od r. 2009 Priorix. V současné době se očkují děti trivalentní vakcínou, 1. dávka je aplikována od 15. měsíce věku, 2. dávka je doporučena za 6 až 10 měsíců. Po zavedení plošného očkování v r. 1987 došlo k výraznému poklesu roční incidence příušnic, ročně bylo hlášeno okolo 500-1000 případů. V letech 2005-2006 došlo opět k výraznému vzestupu počtu případů příušnic, v r. 2006 to bylo více než 5000 případů. V následujících letech došlo opět k poklesu roční incidence, ale od r. 2010 opět pozorujeme nárůst [Tab. 1]. Na rozdíl od předvakcinační éry je maximum nemocných ve věkové skupině 15-24 let a jedná se v drtivé většině o osoby, které byly proti příušnicím řádně očkovány

Tab. 1. Incidence příušnic v ČR 2002-2012 (EPIDAT)



### Možné příčiny onemocnění příušnicemi ve vakcinované populaci

Příušnice se objevují ve vakcinované populaci celého světa, o příčině nedostatečné účinnosti vakcinace se široce diskutuje. Jednou z možných příčin je změna cirkulujících genotypů virů, proti kterým je vakcína nedostatečně účinná. Nejčastěji používaný vakcinační kmen viru parotitidy Jeryl-Lynn je genotyp A, zatímco v ČR od r. 2005 cirkuluje genotyp G. Možnou příčinou je také postupný pokles ochranného účinku očkování s poklesem hladin protilátek. Svou roli jistě hrají i rozdíly v individuální imunitní reaktivitě, ochranný efekt očkování nelze zjednodušit pouze na hladiny protilátek, protože důležitou roli zde hraje rovněž buněčná imunita.

### Laboratorní diagnostika příušnic

V případě primoinfekce, tedy u osob neočkovaných, je laboratorní diagnostika příušnic poměrně snadná. V séru se objevují nejprve specifické IgM protilátky, následují IgG. Z metod přímého průkazu lze provést izolaci viru na tkáňových kulturách nebo detekovat virovou RNA metodou PCR. Vhodným materiálem je sčěr z bukalní sliznice, popřípadě moč, likvor nebo sérum v závislosti na fázi a lokalizaci infekce.

U očkováných pacientů je laboratorní diagnostika svízelnější. Většina laboratoří provádí pouze stanovení IgG a IgM protilátek proti příušnicím. Tyto parametry však u očkováných ve většině případů nejsou dostatečně informativní. IgM je pozitivní v akutní fázi onemocnění pouze u 10-15% očkováných a pozitivní IgG jsou postvakcinační. Problémem přímé diagnostiky je to, že u očkováných je virus vylučován

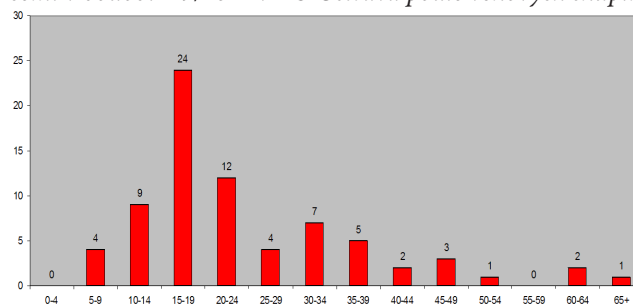
kratší dobu a v menším množství než u primoinfekce, proto i přímá diagnostika u očkováných často selhává. Pro úspěšnost PCR diagnostiky je nutný co nejčasnější odběr vzorku (do 3. dne), ideální je sčěr přímo z ústí Stenonova vývodu a vzorek by měl být okamžitě doručen do laboratoře. I za dodržení těchto ideálních podmínek je PCR pozitivní pouze u 20-35% pacientů.

Ukázalo se, že velmi důležitým, ale bohužel opomíjeným parametrem v diagnostice příušnic u očkováných, je stanovení specifických IgA protilátek, které jsou pozitivní v akutní fázi u většiny nemocných. Významnou roli hraje rovněž stanovení dynamiky titru KFR v párových sérech.

### Soubor pacientů a výsledky

V období leden až září 2012 bylo na virologickém oddělení CKL ZÚ Ostrava vyšetřeno celkem 323 pacientů na protilátky proti příušnicím. Byly použity metody KFR, ELISA IgG, IgM, IgA. U 74 pacientů (22,9%) byla laboratorně potvrzena diagnóza příušnic. Jednalo se o 41 mužů a 33 žen ve věku 6 až 90 let, jejich průměrný věk byl 25 let a medián 19 let [Tab. 2].

Tab. 2. Počet pacientů s laboratorně prokázanými příušnicemi v období 1-9/2012 v ZÚ Ostrava podle věkových skupin



U 58 pacientů, tedy 78% z celkového počtu pacientů s příušnicemi, byla diagnóza stanovena již na základě vyšetření prvního vzorku. Z nich u 15 pacientů byly pozitivní IgM, u 53 pacientů byly pozitivní IgA. 10 pacientů mělo současně pozitivní IgM i IgA. 55 pacientů mělo pozitivní IgG, 2 měli IgG hraniční a 1 IgG negativní [Tab. 3].

U 16 pacientů (22%) byla diagnóza potvrzena až na základě vyšetření 2. vzorku krve. Druhý vzorek byl odebrán v odstupu 4 dny až 36 dní od prvního vzorku. U všech 16 došlo k signifikantnímu vzestupu (15x), popřípadě poklesu (1x) KFR titru [Obr. 2]. U 4 z nich se ve druhém vzorku objevily IgM, u 7 z nich IgA. 2 pacienti měli ve druhém vzorku pozitivitu IgM i IgA současně [Tab. 4].

Více než 1 vzorek krve byl odebrán jen u 78 (24%) z celkového počtu 323 pacientů s požadavkem na sérologické vyšetření příušnic. Nelze tedy vyloučit, že by laboratorně potvrzených případů mohlo být více, kdyby byly párové vzorky vyšetřeny u většího počtu pacientů s negativním výsledkem prvního vzorku.



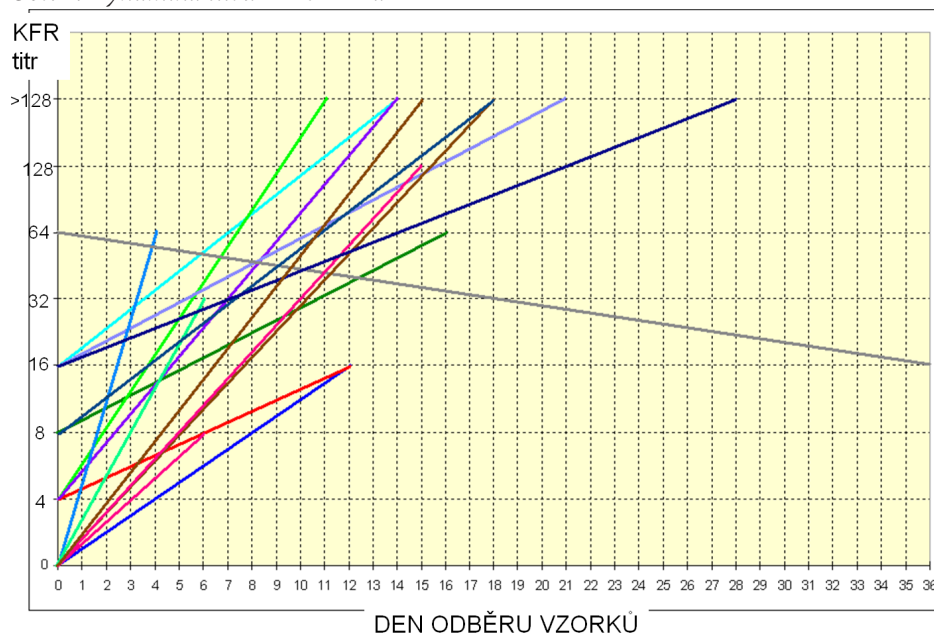
Tab. 3. Výsledky vyšetření 1. vzorku u pacientů s příušnicemi (n=74):

	počet	%
pozit. IgM	15	20%
pozit. IgA	53	72%
pozit. IgM+IgA	10	14%
pozit. IgM nebo IgA	58	78%
negat. IgA i IgM	16	22%

Tab. 4. Výsledky vyšetření 2. vzorku u pacientů s příušnicemi, u nichž IgM i IgA v prvním vzorku byly negativní (n=16):

	počet	%
pozit. IgM	4	25%
pozit. IgA	7	44%
pozit. IgM+IgA	2	12%
pozit. IgM nebo IgA	9	56%
signif. vzestup/pokles KFR	16	100%

Obr. 2. Dynamika titru KFR – K1 a K2



### Závěr a doporučení

Příušnice jsou v současné době aktuálním problémem navzdory plošnému očkování. Drtivá většina případů se objevuje u vakcinovaných osob. Na rozdíl od prevakcinační éry jsou nyní v ČR nejčastěji postiženou věkovou skupinou adolescenti a mladí dospělí do 25 let.

Laboratorní diagnostika je u vakcinovaných osob poněkud obtížnější než u primoinfekcí, v případě správně zvolených diagnostických postupů je však dostatečně spolehlivá i u očkovanych. Důraz je kladen na stanovení specifických IgA. V případě negativity prvního vzorku je nezastupitelnou me-

todou KFR pro možnost zhodnocení dynamiky titru komplementifixačních protilátek. Pokud je v prvním vzorku negativní IgM i IgA a klinické podezření na příušnice trvá, je vždy doporučen odběr druhého vzorku s odstupem 1-2 týdnů. Přímá diagnostika (PCR, kultivace) má v případě příušnic u očkovanych jen pomocný význam, klíčový je správně zvolený a správně odebraný vzorek a jeho okamžitý transport do laboratoře. Pozitivita přímé metody je jednoznačným průkazem infekce, avšak pozitivní nález lze očekávat pouze u 20-30% vakcinovaných pacientů. Izolace viru nebo PCR s následnou sekvenací a určením genotypu je významná zejména z důvodů epidemiologických.

### Literatura

Dayan G.H., Rubin S. Mumps Outbreaks in Vaccinated Populations: Are Available Mumps Vaccines Effective Enough to Prevent Outbreaks? *Clinical Infectious Diseases* 2008; 47: 1458-67

Rožnovský L., Orságová I., Martinková I., Beneš Č. Epidemická parotitida – pokračující epidemie na východě ČR, *Pediatr. pro Praxi*, 2007; 3: 148-151

Torner N., Costa J., Anton A. et al. Mumps enhanced surveillance: pitfalls in laboratory diagnosis, 22<sup>nd</sup> ECCMID, London, 2012

## Diagnostika larvální toxokarózy

Hana Bílková Fránková, Romana Mašková

### Historie

Poprvé byla larvální toxokaróza popsána v roce 1950, kdy v granulomu na sítnici oka dítěte byla nalezena larva. V roce 1951 je publikován nález larev *Toxocara sp.* v mozku malého chlapce, který zemřel v důsledku zánětu mozkových blan, v roce 1952 Beaver a kol. popsali sérii podobných klinických případů u dětí s výraznou eozinofilií. Od té doby jsou larvy *Toxocara sp.* popisovány v různých lézích oka a dalších mnoha orgánů po celém světě.

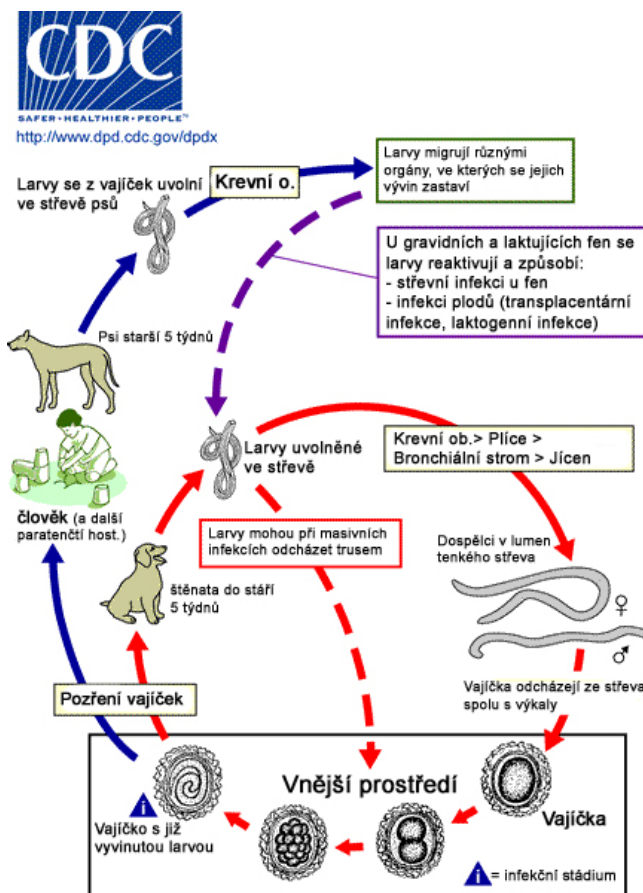
### Původce onemocnění

V našich podmínkách jsou původcem onemocnění larvy druhů *Toxocara cati* (škrkavka kočičí) a *Toxocara canis* (škrkavka psi). Definitivním hostitelem tohoto parazita jsou psi a psovitě šelmy, kočky a kočkovité šelmy. Tělo dospělých škrkavek je na obou koncích zašpičatělé, pokryté kutikulou nažloutlé barvy. Samci měří 9–13 × 0,2–0,25 cm, samičky 10–18 × 0,25–0,3 cm, přední konec škrkavek je opatřen latelárními křídélky, samec má na ocasním konci kónusovitý prstovitý výběžek.

### Vývojový cyklus

Dospělé škrkavky žijí v tenkém střevě definitivního hostitele (zde psa nebo kočky), kde se živí střevním obsahem a pohlavně se rozmnožují. Samičky produkují oplozená vajíčka a ta jsou vylučována s trusem do vnějšího prostředí, kde se postupně rýhují. Rýhováním se vyvíjí larva 1. generace (L1), která se ve vajíčku dvakrát svléká do stádia infekční (L3) larvy. Rychlost vývoje larvy je závislá na teplotě a vlhkosti vnějšího prostředí. Vysoké teploty a teploty pod bodem mrazu vajíčka usmrcují. Definitivní (i paratenický) hostitel se nakazí pozřením vajíček obsahující L3 larvy, ty se v tenkém střevě z vajíčka uvolní, pronikají stěnou střevní a krevními kapilárami do jater, odtud žilním oběhem do pravého srdce a odtud do plic, kde se dále vyvíjejí. Při průniku plicní tkáně larvy poškozují plicní sklípky a sliznici dolních cest dýchacích. Postupně se dostávají do průdušnice a jsou-li vykašlány a polknuty, dostávají se zpět do tenkého střeva, kde se naposledy svlékají a pohlavně dospívají. Do střeva se larvy dostávají zhruba za 10 dní po pozření vajíček. Dospělci škrkavek ve střevě kopulují a samičky následně produkují vajíčka. Takto popsaný cyklus je označován jako tracheální migrace. Při somatické migraci se larvy dostávají z plic do velkého krevního oběhu a krví jsou roznašeny do všech orgánů, nejčastěji jater, ledvin, podkoží, svaloviny, mozku ale i oka. Zde se usazují, opouzdřují a mohou zůstat velmi dlouhou dobu životaschopné.

Bylo prokázáno, že infekce mladých psů velkým počtem vajíček vede převážně k somatické migraci, zatímco nízký počet vajíček snáze dokončí vývoj jako pohlavně dospělé škrkavky ve střevě. U dospělých a starších zvířat však obecně dochází především k somatické migraci. Larvální stádia deponovaná (jako výsledek somatické migrace u dospělých psů) v různých orgánech jsou pak zdrojem transplacentární nákazy štěňat (u koťat NE!). Po narození se štěňata i koťata navíc mohou infikovat i mlékem feny (kočky) = laktogenní přenos. /Obr. č.1/



### Nákaza psa – sledování vývoje vajíčka

V naší laboratoři jsme vyšetřili 7mi měsíčního psa rhodského ridgebacka z důvodu neprospívání. Pes pochází ze zanedbaného chovu, kde nepředpokládáme pravidelné vyšetřování zvířat ani jejich odčervování. Trus jsme vyšetřili koncentrační metodou dle Fausta a nátěrem dle Kató. Nalezli jsme značné množství vajíček *Toxocara canis*. Vzorek umístili do termostatu do vlhké komůrky a vývoj vajíčka monitorovali. 14. den jsme na vajíčka působili kyselinou chlorovodíkovou a očekávali uvolnění larev. Následující snímky (Obr. 2 – 9) vývoj larvy dokumentují (0., 1., 2., 3., 6., 8., 8., 14. den kultivace).

### Klinické příznaky onemocnění u psů

Klinická manifestace onemocnění je typická zejména pro štěňata, migrující larvy škrkavek v plicích vyvolávají kašel, výtok z nosu, slabost a schvácenost. Přítomnost dospělých škrkavek ve střevě štěňat může způsobit neprůchodnost střeva s následnou rupturou střeva. Postižená štěňata mají zvětšené, bolestivé tzv. *škrkavkové břicho*. To je doprovázeno zvracením, průjmem, zvířata hubnou, mají matnou srst.

### Klinické příznaky onemocnění u člověka

V ČR se uvádí séroprevalence okolo 20 %, ale skutečný počet pacientů nemocných toxokarózou je daleko nižší, většina onemocnění probíhá bez příznaků (=skrytá forma).

Člověk se může nakazit pozřením vajíček *T. canis* s infekčními larvami L3 z prostředí nebo přímo larvami od jiného paratenického hostitele. Rozvoj klinických obtíží

závisí na počtu pozřených infekčních vajíček, na lokalizaci larev a zejména na stavu imunitního systému.

Pokud se objeví klinické příznaky, pak je jejich nástup pozvolný a často nespecifický, s čímž souvisí i pozvolný nástup specifické imunitní odpovědi. Častým projevem onemocnění může být kopřivka s následným rozvojem dráždivého kašle, bolestí na hrudi, bolestí břicha, nechutenstvím, nevolností, teplotami (obvykle 1-3 týdny po infekci), únavou, hepatomegalií (jaterní tkáň = predilekční místo lokalizace larev), u dětí jsou pak typické poruchy chování. Jsou-li postiženy vnitřní orgány, hovoříme o viscerální toxokaróze. Zvláštní pozornost je věnována oční formě toxokarózy, kdy larvy migrují a usazují se v oku (chorioretinitis, poruchy vizu).

### Diagnostika

Vzhledem k nedokončení vývoje larev do stádia dospělých škrkavek je průkaz protilátek vedle zobrazovacích technik jedinou možnou diagnostickou metodou. K vyšetření je možné odebrat srážlivou krev v minimálním množství 5 ml krve nebo sérum získané z tohoto množství krve. Při podezření na oční formu doporučujeme odebrat nitrooční tekutinu, (sklívec) v množství 20 µl neředěného materiálu. Lze rovněž vyšetřit mozkomíšni mok, zde potřebujeme k vyšetření minimálně 400 µl materiálu.

U larvální toxokarózy zjišťujeme obvykle zvýšenou eozinofilii, leukocytózu, lymfopenii, hypergamaglobulinémii, zvláště elevaci celkových IgE.

Základní diagnostickou metodou pro potvrzení (vyloučení) diagnózy je imunoenzymatický průkaz specifických anti IgG protilátek za použití ES antigenů larev L3 získaný jejich kultivací v tkáňovém médiu (ELISA). Pro stanovení fáze infekce je vhodné vyšetřit sílu vazby IgG protilátek stanovením jejich avidity. Jako doplňující (konfirmační) test slouží průkaz přítomnosti protilátek proti jednotlivým, vysoce specifickým, separovaným antigenům *T. canis*, které jsou elektroforeticky rozděleny na nitrocelulózoové membráně dle jejich hmotnosti v kDa.

S falešně negativními výsledky se můžeme setkat ve velmi časně fázi onemocnění, u pacientů s imunopresí nebo u pacientů s oční formou. Falešně pozitivní nálezy mohou být

u pacientů s onkologickým onemocněním, nebo jako důsledek zkřížené reakce u jiného typu tkáňové helmintózy.

V současné době testujeme možnost využití detekce IgA a IgE specifických protilátek pro přesnější určení fáze infekce.

### Prevence, terapie

Prevence spočívá v pravidelném odčervování psů a volně žijících koček. U dospělých psů doporučujeme na základě parazitologického vyšetření trusu, u štěňat a gravidních fen pak pravidelné odčervování. U fen je doporučeno preventivní podání anthelmintik před krytím a po narození štěňat. Důležité je zde opakované odčervování, terapie je účinná pouze na dospělé škrkavky. Prevence dále spočívá v dodržování hygienických zásad, zejména např. po kontaktu se psy nebo kočkami, po kontaktu hlínou (pečlivé omývání rukou po práci, důkladné omývání ovoce a zeleniny...) či po čištění záchodků domácích zvířat.

K léčbě larvální toxokarózy se používá tiabendazol, dietylkarbamazín, albendazol, popř. mebendazol.

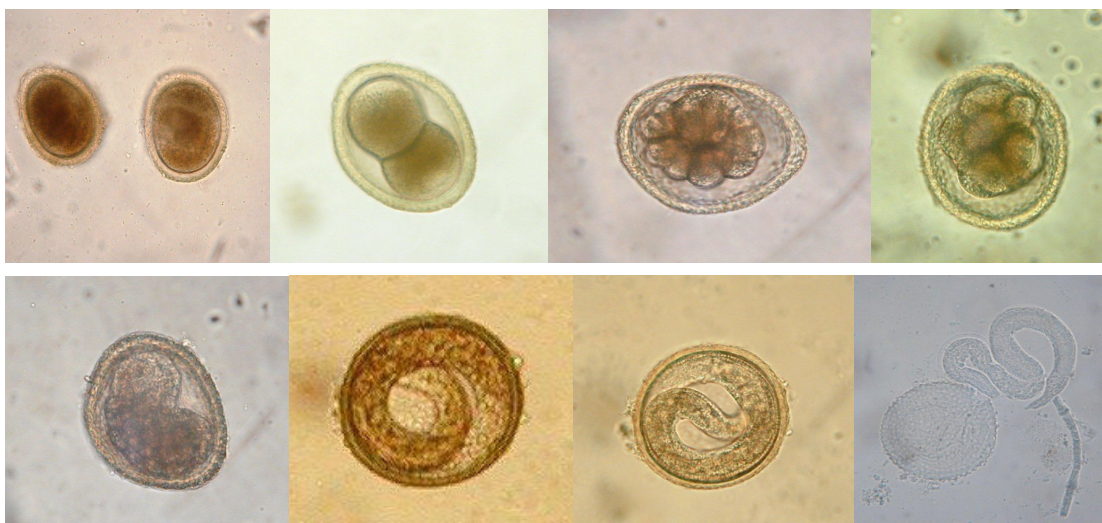
### Výsledky laboratoře

Výsledky za rok 2011 a do 13. 11. 2012, metoda ELISA:

Za výše uvedené období jsme provedli celkem 931 testů, z toho u 33 pacientů jsme metodou ELISA prokázali přítomnost specifických IgG protilátek. U 2 jsme určili nízkou aviditu, u 6 jsme stanovili hraniční aviditu, ve 24 případech jsme stanovili již aviditu vysokou. Zde u 6 pacientů s podezřením na oční formu toxokarózy. U 1 pacienta jsme aviditu z důvodu nedostatku séra nemohli stanovit. U 2 z celkového počtu pozitivních pacientů nebyla diagnóza potvrzena konfirmačním testem (western blotem).

Výsledky za rok 2011 a do 13. 11. 2012, metoda western blot:

Za výše uvedené období jsme provedli celkem 469 testů, z toho jsme u 13 pacientů prokázali přítomnost specifických protilátek pouze metodou western blot, z toho ve 4 případech u pacientů s „oční“ diagnózou. U 41 pacientů jsme určili metodou western blot hraniční výsledek, bez pozitivitu v metodě ELISA, z toho v 5 případech s podezřením na infekci oka.



**Závěr**

Pro potvrzení (vyloučení) diagnózy larvální toxokaróza doporučujeme vyšetřit sérum (sklivec či mozkomíšni mok) jak metodou ELISA, tak i metodou western blot. V případě

záchytu specifických protilátek je u prvního vyšetření nutné stanovit sílu vazby IgG protilátek. O výsledku testování využití detekce IgA a IgE protilátek Vás budeme informovat.

**Literatura:**

Jíra J. Lékařská helmintologie, Praha, 1998, Galén.

Uhlíková M., Hübner J. Larvální toxokaróza, Praha 1983, Avicenum.

Stejskal F. Současná léčba helmintóz, Klinická Farmakologie a farmacie, 2005; 19: 111–115

Uhlíková M., Hübner J., Leissová M. Oční forma larvální toxokarózy v České republice, Čs. Oftal., 58, 2002; 2:75-83

www.medscape.com

http://dpd.cdc.gov/dpdx/html/Toxocariasis.htm

www.test-line.cz

## Interpretace kvantitativních výsledků získaných metodou real-time PCR

Jakub Mrázek

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je dnes již standardním nástrojem využívaný nejen v diagnostice infekčních onemocnění. Umožňuje rychlý a citlivý průkaz původce infekce. Využívá se především tam, kde jiný přímý průkaz infekce není možný, či je příliš zdoluhavý.

Prostý průkaz přítomnosti či nepřítomnosti konkrétního agens však nemusí být vždy dostačující. Za účelem interpretace klinické významnosti nálezu, pro potřeby volby léčebné strategie či pro samotný management léčby je v některých situacích vhodné určit také množství infekčního agens v testovaném klinickém materiálu. Kvantifikace DNA, resp. RNA je tak dnes často nezbytná, a to zvláště v diagnostice virových infekcí.

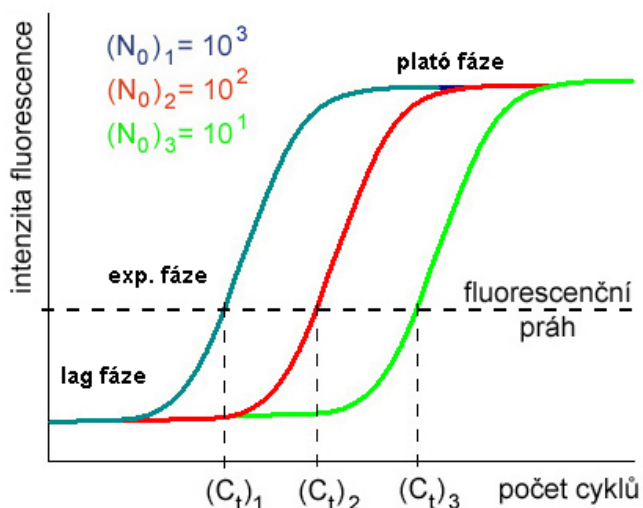
**Real-time PCR**

Real-time PCR umožňuje, narozdíl od klasické PCR s detekcí produktu na agarózovém gelu, průběžné monitorování tvorby produktu pomocí fluorescenčního značení, ať už nespecifickou interkalační barvičkou (obvykle SYBR Green I) či fluorescenčně značenou sondou (nejčastěji typu Taq-Man®). Monitorování tvorby produktu PCR reakce umožňuje sledovat reakci ve fázích, kdy je její průběh dán relativně přesnými a měřitelnými matematickými závislostmi, díky čemuž lze „dopočítat“, jaký počet kopií cílené DNA stálo na počátku reakce.

**Kvantitativní PCR**

Průběh PCR reakce je možno rozdělit na tři fáze (viz. obr.1): 1. *Lag fáze*, kdy v reakci zdánlivě neprobíhají žádné změny, nárůst fluorescenčního signálu kopírujícího tvorbu produktu je překryt signálem pozadí, 2. *Exponenciální fáze*, kdy dochází k překročení fluorescenčního prahu a následnému exponenciálnímu nárůstu signálu, resp. produktu a 3. *Plató fáze*, kdy signál (ani produkt) již dále z celé řady důvodů nepřibývá (vyčerpání systému, kompetičně-inhibiční procesy v reakci, apod. ...).

Obr.č.1: Průběh real-time PCR



Právě exponenciální fáze poskytuje matematicky definovatelnou zákonitost reakce, kdy:

$$N_c = N_0(E)^c$$

Kde:

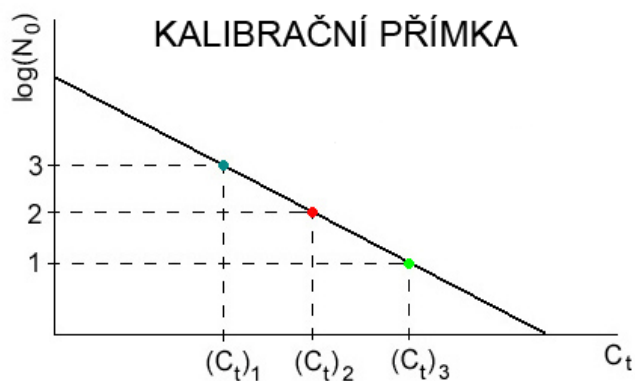
$N_c$  = počet kopií DNA v cyklu  $c$

$N_0$  = počet kopií na počátku reakce

$E$  = efektivita amplifikace

Z toho vyplývá, že na množství vstupní specifické DNA závisí okamžik (cyklus  $c$ ), ve kterém dojde k přechodu z lag fáze do fáze exponenciální, tedy jednoznačnému překročení fluorescenčního prahu signálem tvorby produktu. Tento okamžik označujeme jako threshold cycle ( $C_t$ ) a jeho hodnota je nepřímě lineárně úměrná dekadickému logaritmu koncentrace vstupní cílové DNA a umožňuje tak konstrukci kalibrační přímky (viz. obr.č.2).

Obr. č.2: Kalibrační přímka real-time PCR



Kterýkoli bod kalibrační přímky odpovídá určité konstantní hodnotě ( $\log N_{Ct}$ ), již každá jednotlivá reakce dosahuje dříve či později ( $C_t$ ) v závislosti na počáteční kvantitě specifické DNA ve vzorku ( $N_0$ ) při dané efektivitě reakce. Platí rovnice:

$$C_t = -(1/\log E) \cdot \log N_0 + (\log N_{Ct} / \log E)$$

Kde:

$C_t$  = threshold cycle

$N_{Ct}$  = počet kopií DNA v cyklu  $C_t$  (při crossing pointu)

$N_0$  = počet kopií na počátku reakce

$E$  = efektivita amplifikace

Hodnoty  $E$  a  $N_{Ct}$  lze nahradit konstantami, pak platí jednoduchá rovnice:

$$C_t = -A \cdot \log N_0 + B$$

kde konstanty  $A$  a  $B$  získáme měřením série kalibrátorů,  $C_t$  měřením vzorku a jedinou neznámou, kterou je dekadický logaritmus koncentrace vstupní DNA, pak odečteme z kalibrační křivky.

### Úskalí kvantitativní PCR

Pro správnou interpretaci kvantitativních dat získaných metodou real-time PCR je nutno mít na zřeteli několik důležitých faktorů:

**Přesnost kvantifikace:** PCR reakce využívá exponenciálního jevu, kdy v každém cyklu reakce dojde ke zdvojnásobení produktu předchozího cyklu. Už z tohoto důvodu se PCR nejvíce jako ideální nástroj pro kvantifikaci, protože i malá chybička na začátku reakce může exponenciálně narůst ve velkou chybu. Na druhou stranu real-time PCR umožňuje provádět kvantifikaci v rámci mnoha, běžně 5-8, řádů. V tomto ohledu poskytuje dostatečně spolehlivé výsledky, je třeba si však uvědomit, že **rozdíly v rozmezí jednoho logaritmu (řádu) nemusí být významné.**

Z tohoto důvodu jsou kvantitativní výsledky obvykle uváděny v **matematickém formátu**, kdy jeden milion zapisujeme jako  $1,0E+06$ . Číslice za symbolem  $E$  označují **řád, který má největší váhu**, hodnota před symbolem  $E$  pak již jen upřesňuje výsledek v rámci řádu.

**Limit kvantifikace:** Reprodukovatelnost výsledku vysoce pozitivních vzorků je logicky lepší, než slabě pozitivních výsledků, protože k dosažení threshold cycle stačí menší počet cyklů a dojde tedy k menší akumulaci chyb. U velmi nízkých

počtů kopií (1-20) navíc vstupuje jako významný zdroj chyb do hry vzorkovací náhodná chyba (tzv. Poisson error), kdy pravděpodobnost, že se podaří opakovaně do reakce vložit stejné množství malého počtu kopií prudce klesá.

Velmi nízké kvantitativní výsledky (řádově stovky a méně) získané metodou real-time PCR jsou tak zatíženy natolik velkou chybou, že nemá prakticky smysl jejich hodnotu uvádět. Udávají se tedy např. jako: **<500 nebo <100**. Takovýto výsledek znamená, že **byla prokázána přítomnost daného agens, ale jeho množství bylo menší než uvedená hodnota. Negativní nálezy jsou u kvantitativních metod vyjádřeny hodnotou 0**. Přesto, jako každá analytická metoda, i real-time PCR má svůj detekční limit, takže nula nevyklučuje přítomnost agens v rozsahu mezi nulou a detekčním limitem metody, který je však u PCR metodik obecně velmi nízký.

**Správnost kvantifikace:** Absolutní hodnoty (nejčastěji kopie/ml primárního vzorku) vytvářejí dojem, že víme, kolik se ve vzorku daného mikroorganismu nachází. Nicméně každý výsledek, který získáme je vztažen k té či oné kalibrační přímce (kalibračním standardům), vykazuje sice výbornou reprodukovatelnost, ale správnost absolutní hodnoty je závislá na technologii, která byla použita pro určení hodnoty standardů. Faktem je, že různé přístupy vedou k poměrně výrazně odlišným výsledkům, a tak je nutno podotknout, že **každý kvantitativní výsledek může být sice přesný, ale je relativní a nemusí vždy odpovídat výsledku získaného jinou laboratoří**, či jinou metodou. Proto, zvláště za účelem monitorování pacienta **je nutné pacienta vyšetřovat ve stále stejné laboratoři**.

Částečným řešením tohoto problému, který je do značné míry brzdou ve standardizaci molekulárně biologických metod, je použití dohodnutého mezinárodního standardu, ke kterému budou vztahovány všechny metody, takže konečné absolutní výsledky budou zatíženy „stejnou chybou“. Používáme tak nikoli kopie (absolutní výraz), ale IU – mezinárodní jednotky, čímž se vyhýbáme absolutní otázce – kolik viru se ve vzorku nachází. Přepočtení mezi kopiemi a IU pak lze pouze odhadovat v určitém rozptylu. V současné době je mezinárodní standard k dispozici pro HCV, HBV, HAV, HIV, CMV, EBV a Parvovirus B19.

### Využití kvantitativních výsledků v praxi

Kvantitativních výsledků se využívá např. k posouzení klinické významnosti průkazu daného mikroorganismu. Uplatňuje se především tam, kde je běžná bezpříznaková kolonizace, resp. perzistence mikroorganismu u člověka. Typickým příkladem jsou herpetické viry, které po primární infekci u člověka perzistují v hostitelské buňce a mohou se za určitých okolností reaktivovat a vyvolávat onemocnění s různým stupněm závažnosti. V praxi se využívá kvantifikace CMV, EBV a HHV6. Nález HSV 1/2, resp. VZV lze prakticky vždy považovat (samozřejmě s ohledem na klinický obraz) za významný, protože tyto viry perzistují v nervových gangliích, které se za běžných okolností nevyšetřují. Přítomnost HSV 1/2, VZV se vyšetřují materiálech typu krev, likvor, stěry z kožních lézí, kde se virus vyskytuje při primární infekci či reaktivaci.

Virus EBV je možno často díky perzistenci běžně zachytit v plné krvi zdravých jedinců, kteří již prodělali primoinfekci tímto virem. Laboratorně se vyšetřuje nikoli plná krev, ale plasma, v níž nálezy pod cca 1500 cp/ml lze považovat (s ohledem na klinický stav pacienta) za nevýznamné.

Podobně je tomu při detekci DNA CMV, kdy i u zdravých jedinců můžeme v určitých obdobích (typicky např. v těhotenství) zachytit stopy DNA CMV v krvi či moči, aniž by bylo nutné jim přiřadit větší význam. Jinak je tomu u pacientů imunosuprimovaných, např. po transplantačních výkonech, kdy je nutné případnou virémiu u pacienta pečlivě sledovat. U pacientů léčených na CMV infekci je toto monitorování samozřejmostí, což je nejčastější situace vyžadující použití kvantitativní real-time PCR.

BK virus patří mezi polyomaviry. Po primoinfekci přetrvává BK virus v ledvinových buňkách a za podmínek imu-

nosuprese může dojít k jeho reaktivaci, zvláště v souvislosti s transplantací ledvin, a to asi u 1 až 10% pacientů. Monitorování BK virurie a virémie umožňuje včasnou diagnózu BK replikace, management imunosupresivní terapie a monitorování odezvy na léčebná opatření.

Monitorování virové nálože je také nezbytné pro léčbu virové hepatitidy B a C. Vstupní virová nálož, i rychlost a rozsah odezvy na antivirovou terapii je důležitým ukazatelem, který umožňuje optimalizaci léčebného režimu a je také významným prognostickým faktorem.

Kvantitativní PCR metody jsou dnes nenahraditelným nástrojem v diagnostice vybraných infekčních onemocnění. Oddělení molekulární biologie má již téměř 10 letou zkušenost s těmito technikami a nabízí jejich aplikace ve všech klinicky relevantních situacích v rámci infekční problematiky.

## Interpretace serologických metod v klinické mykologii

Radim Dobiáš, Stanislava Dobiášová

V případech, kdy nejsme schopni prokázat původce mykotického onemocnění mikroskopicky nebo kultivačně a pacient vykazuje klinický obraz mykotické infekce, využívá klinická mykologie různých metod prokazujících nebo alespoň vedoucích k průkazu těchto agens. Mykotická agens lze serologicky prokázat pomocí přímého průkazu antigenu, částice která je součástí těla původce, nebo pomocí detekce protilátek, nepřímého průkazu daného agens v závislosti na imunitní odpovědi lidského organismu a čase. Mykologická serologie je záležitostí relativně nedávné doby. V praxi se používaly a stále používají serologické metody starší a k nim se postupem času a technického pokroku přidaly metody modernější, které ty starší mnohdy nahradily.

### Mykotická agens

Původci mykotických onemocnění jsou svým původem saprofytickou složkou prostředí a přirozeně kolonizují vnitřní prostředí lidského organismu. Z celé řady zástupců těchto mikromycetů se v závislosti na stavu lidského imunitního systému a harmonii lidského organismu takzvanými oportunními patogeny teprve stávají.

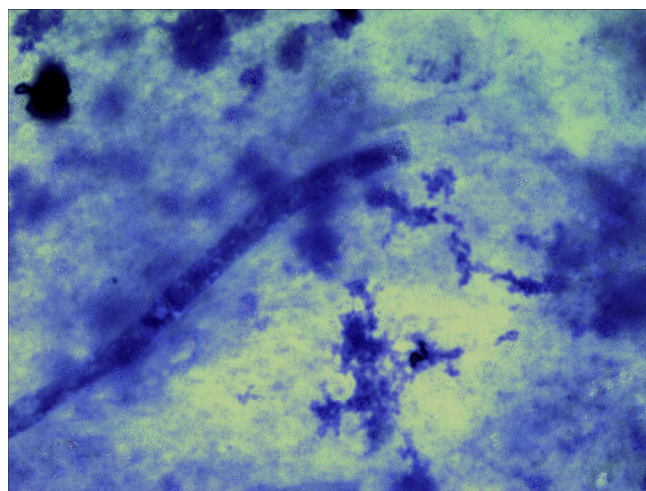
Oportunní patogeny se mohou rozdělit do několika skupin, podle příslušnosti k jednotlivým rodům: *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Trichoderma* a další méně obvyklé rody.

Příslušníci rodu *Candida* jsou kvasinky a kvasinkovité mikromycety. Jedná se o běžnou flóru sliznic a kůže a ve většině případů jde o infekci endogenní. Nejvíce zastoupeným oportunním patogenem rodu *Candida* je druh *Candida albicans*.

Ze zástupců rodu *Aspergillus* je odpovědný za 90% všech případů invazivní aspergilózy druh *Aspergillus fumigatus* (Serrano R., 2011).

V případě oportunních infekcí způsobených druhy rodu *Candida* se v minulosti využívaly testy pro průkaz mananu kandidového antigenu latexovou aglutinací a testy pro průkaz protilátek metodou dvojité imunodifúze při tvorbě precipitační linie. Tyto testy vynikaly svou nízkou nákladností, ale také velmi vysokým detekčním limitem, to znamená, že byly příliš málo citlivé a pro časnou diagnostiku závažných případů nevhodné. V současné době lze použít modernější, citlivější a flexibilnější metody EIA, jak pro průkaz antigenu (mananu) tak pro průkaz protilátek rodu *Candida*. Průkaz polysacharidového antigenu (manan) je specifický pro druhy rodu *Candida*, bohužel je rychle vyvázan, vyplavován z krevního oběhu a senzitivita testu je nízká, podle různých údajů 30-70% (Ráčil, 2007). Senzitivitu lze dále zvyšovat při současném použití testu pro průkaz protilátek proti mananu a to až na 80% (Ráčil, 2007). Je možno také rozšířit testování o další kritéria detekce jako jsou monitorování hladin

Obr. 1 Fragment vlákna *Aspergillus flavus*, Giemsa-Romanowski, 1000x



imunoglobulinů třídy A, G, M pro nejrozšířenější oportunní patogen *Candida albicans*.

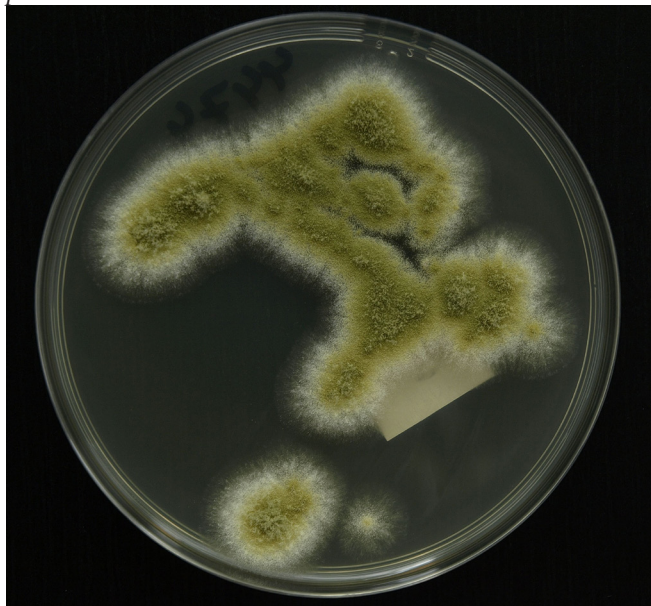
Mezi solitérní druhy oportunních patogenů s afinitou k nervové soustavě, patří *Cryptococcus neoformans*, který mezi imunodeficientními pacienty působí poměrně vysokou mortalitou. Zde je na místě v mnoha případech myslet na test, který je schopen prokázat antigen glukuronoxylomanan latexovou aglutinací přímo z liquoru nebo ze séra.

V případě oportunních infekcí působených druhy rodu *Aspergillus* se v minulosti využívaly testy pro průkaz galaktomananu aspergilového antigenu latexovou aglutinací. Podobně jako testy pro rod *Candida* vykazovaly průkazy aspergilového antigenu latexovou aglutinací nízkou citlivost pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy. V současné době lze využít metodu EIA pro průkaz galaktomananu specifického pro druhy rodu *Aspergillus* ze séra nebo bronchoalveolární laváže (BAL). Při detekci galaktomananu test dosahuje senzitivity 95,2%, je specifický na 90%, s negativní prediktivní hodnotou 99,7%. Avšak z důvodu falešných pozitivit, z nichž ne všem lze zabránit, dosahuje pozitivní prediktivní hodnoty jen 31,5% (Ráčil, 2008). V takovémto případě se opět nabízí možnost doplnit tento test o průkaz protilátek. Vzhledem k tomu, že za 90% všech případů invazivní aspergilózy je odpovědný druh *Aspergillus fumigatus* lze použít interpretačně zajímavý test pro průkaz a monitoring hladin protilátek, imunoglobulinů třídy A, G, M (Tsagarakis, 2009). Pro vykrytí nebo vyloučení případného výskytu některých dalších méně se vyskytujících druhů lze využít starší, méně citlivější, ale v tomto případě opodstatněnou metodu pro průkaz protilátek pomocí dvojité imunodifúze, která zahrnuje navíc druhy *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*.

### Interpretace

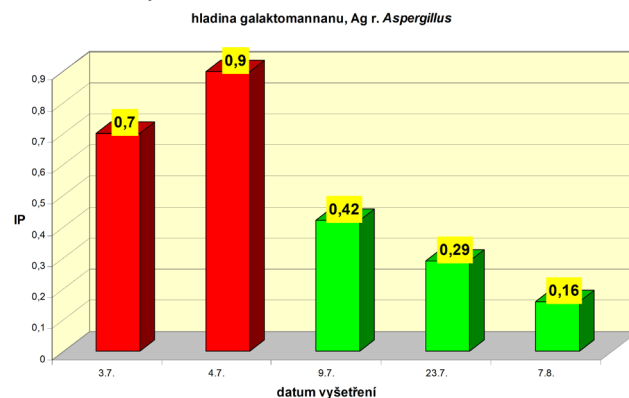
Interpretace výsledků průkazu galaktomananového antigenu rodu *Aspergillus* by měly být v rámci možností podpořeny klinickým obrazem pacienta, dalšími dílčími markery zobrazovacích metod například HRCT apod. V ideálním

Obr. 2 *Aspergillus flavus*, po 72 hodinové kultivaci, SV, při 28 °C



případě by se v některých s dalších vzorků pacienta měl mikroskopicky nebo kulturačně potvrdit a přesně determinovat původce (Obr. 1 a 2), i když tomu v četných případech tak není a tím spadá celý případ do kategorie podezřelých a původce se kolikrát prokáže až po určité době, dle stavu pacienta. Tyto jevy by se také daly připisovat různým druhům léčby (preemptivní, profylaktická). Infekční mykotické agens je při dobrých podmínkách lidského imunodeficitu velmi houževnaté a při nedostatečné léčbě takzvané „naslepo“ se velmi špatně mikroskopicky a kulturačně potvrzuje neboť v lokalitách jejího primárního výskytu (horní cesty dýchací) již prakticky chybí a je lokalizováno jinde v orgánech cestou diseminace. Při průkazu galaktomananového antigenu rodu *Aspergillus* je také důležité myslet na opakované odběry v rámci monitoringu hladiny antigenu léčného pacienta (obr.3). U vzorků séra se považuje za hraniční hodnotu pozitivity, index pozitivity (IP) od 0,5-0,8, za pozitivní hodnotu IP 0,8 a výše. U vzorků BAL je doporučováno posuzovat jako pozitivní hodnoty IP od 1,0 a výše.

Obr. 3 Hladina galaktomananu v séru našeho pacienta při zavedení léčby voriconazolem



Pro zvýšení senzitivity průkazu mykotické infekce používáme průkaz protilátek imunoglobulinů třídy A, G a M proti *Aspergillus fumigatus*. Při hodnotě IP 0-0,8 výsledek negativní, IP 0,8-1,2 je takzvaná šedá zóna s doporučením v rámci sledování opakovat odběr a při IP větší než 1,2 pozitivní. Protilátková odpověď a vzestup hladiny imunoglobulinů třídy A znamená časnou odpověď imunitního systému na infekci jejíž branou vstupu jsou sliznice. Protilátková odpověď a vzestup hladiny imunoglobulinů třídy M znamená časnou formu odpovědi humorálního imunity na infekci. Po určité době časné protilátky, imunoglobuliny třídy M mizí a souběžně dochází k vzestupu imunoglobulinů třídy G, dlouhodobé protilátkové odpovědi. Následně při přetrvávající infekci lze monitorovat vzestup a pokles těchto hladin protilátek. Při vzestupu hladiny imunoglobulinů třídy G samostatně alespoň 1,5 krát je možné říci, že jde o infekci progresující. Při současném vzestupu hladiny imunoglobulinů třídy A i G lze říci, že se jedná o reinfekci.

Pro průkaz protilátek imunoglobulinů třídy A, G a M proti *Candida albicans* platí stejná kritéria jako v případě interpretace uvedené výše pro průkaz protilátek proti *Aspergillus fumigatus*.

**Závěr**

Diagnostika mykotických onemocnění je většinou nelehká, serologické metody poskytují více odrazových hodnot a

další kámen do pomyslné mozaiky vyšetření v oboru klinická mykologie a kombinace jednotlivých vyšetření prakticky zvyšuje senzitivitu a specifitu těchto testů.

**Literatura:**

Serrano R., Gusmao L., Amorim A., et al. (2011): Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. - BMC Microbiology. 2011;11(1):82

Tsagarakis N., Kentrou N., Margariti V., Malgarinou A., Maurea S., Tsagarakis I., Anastasakou E. (2009): Anti-aspergillus antibodies and galactomannan antigen detection for serodiagnosis of aspergillosis. -19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. P905

Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová B., Winterová J., Lengerová M., Moulis M., Mayer J. (2008): Využití detekce galaktomananu pro diagnostiku invazivní aspergilózy u hematologických nemocných. - Vnitř. lék. 2008; 54: 45-52

Ráčil Z., Kocmanová I., Wagnerová J., Lengerová M., Mayer J. (2007): Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematologických nemocných pomocí serologických metod. - Vnitř. Léč. 2007; 53(9): 990-999

## Využití molekulárně biologických metod pro identifikaci méně obvyklých druhů mykobakterií a detekci lékové rezistence *M. tuberculosis*. (uplatnění metod a interpretace výsledků)

Vít Ulmann

**Tuberkulóza**

Klesající incidence onemocnění tuberkulózou (TB) v České republice vede k postupnému poklesu zájmu o toto onemocnění. Laickou veřejností je mnohdy TB vnímána jako jakási „archaická nemoc“, která decimovala obyvatelstvo v dobách dávno minulých. Významnější je ovšem skutečnost, že rovněž dochází k negativní změně pohledu u veřejnosti odborné. Obdobně v ostatních zemích s trvalým poklesem incidence TB postupně dochází ke ztrátě povědomí o významu onemocnění, která se projevuje také opomíjením při diferenciální diagnostice. Na tomto místě je nutno připomenout, že tuberkulóza zůstává běžnou infekcí a onemocněním představujícím významnou zátěž. V celé EU bývá ročně stále hlášeno téměř 80 000 nových případů. Tuberkulóza se stále častěji vyskytuje ve znevýhodněných a marginalizovaných skupinách, například u migrantů, bezdomovců, chudých lidí žijících v okrajových čtvrtích, vězňů, osob s HIV a konzumentů drog. V nejbližších oblastech mimo EU, zejména ve východní Evropě, je možno situaci objektivně hodnotit jako „katastrofickou“. Statistiky incidence TB ve státech bývalého Sovětského svazu, byly dlouhodobě hodnoceny pouze na základě odhadu. V posledních letech, při snaze globálních zdravotnických organizací (WHO, CDC), o zvrácení nepříznivého stavu v rozvojových zemích, jsou do těchto oblastí investovány značné finanční a materiální prostředky. Na základě této podpory dochází k zavádění programu zlepšování systému diagnostiky a také kontroly onemocnění. Výsledkem cíleného monitorování za podpory výše zmíněných organizací, byl zjištěn enormní podíl multirezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB). Především Bělorusko a Kazachstán patří mezi nejvíce zasažené. Procentuální podíl MDR-TB kmenů v Bělorusku u nově zjištěných infekcí dosahuje 32% a dříve léčených až 76%! Obdobná situace panuje na Ukrajině, v pobaltských státech, Moldávii,

uralských a zakavkazských republikách. V zemích západní Evropy, ale již také v ČR vzrůstá podíl emigrantů na celkové incidenci onemocnění oproti domácímu obyvatelstvu. Migrace obyvatel ze zmíněných exponovaných krajin je přirozenou součástí globalizovaného světa, ovšem pro cílové země sebou přináší také novou, zvýšenou epidemiologickou zátěž. Dle výše zmíněného se jeví, že stále větší důraz bude muset být kladen na efektivní screening, důkladné řešení kontaktů pacientů s TB onemocněním a aktivní vyhledávání osob v rizikových skupinách. Svou významnou roli při diagnostice již dlouhodobě potvrzují metody IGRA (Interferon gamma release assays) - Quantiferon-TB gold, nebo TB-Spot. Dle zkušenosti našeho pracoviště, hodnotíme kombinaci molekulárně biologických metod průkazu nukleových kyselin mykobakterií a IGRA, jako velmi vhodnou pro významné zkrácení doby odezvy a urychlení diagnostického závěru. Zejména u mimoplicních forem TB, ale také raných postprimárních a anergních stádií plicního postižení s atypickým průběhem (zejména děti a HIV+). Právě kompletace těchto vyšetření (s ohledem na nižší specifitu IGRA a senzitivitu u molekulárně biologických metod) přináší poměrně spolehlivý výsledek, který pomůže diagnostikovat TB dlouho před kultivačním průkazem agens (tento je mnohdy komplikovaný, nebo nedosažitelný). Prakticky je možno potvrdit specifickou etiologii onemocnění do 48 hodin od obdržení vzorků pacienta. Významná je však včasnost a správná preanalytická fáze odběru vzorků!

K současnému stavu v ČR vedla od 50. let 20. století dlouhá a náročná cesta. Mimo obecně zlepšující se životní úroveň, byl vybudován funkční a efektivní systém diagnostiky (jak klinické tak laboratorní), léčby, prevence a kontroly onemocnění. Cílem všech jednotek zajišťujících zdravotní a epidemiologickou činnost a také úředních orgánů ČR, musí být zachování příznivého vývoje. Zásadní je nepolevit v úsi-



lí na všech úrovních kontroly TB, zavádět a zdokonalovat diagnostické metody, udržovat erudici odborníků a osvětu laické veřejnosti.

### Nové metody urychlující detekci rezistentních kmenů *M. tuberculosis*

Klasické stanovení citlivosti u všech nově izolovaných kmenů *M. tuberculosis* (MTB) je nutností. Standardní vyšetření provádíme v naší laboratoři mikrodiluční metodou, stanovením minimálních inhibičních koncentrací u léků I. řady antituberkulotik - AT (Isoniazid, Rifampicin, Streptomycin a Etambutol). Poskytuje přesný a definitivní výsledek a slouží jako zásadní podklad pro eventuelní změnu léčby a dalšího řešení pacienta. Zmíněné testování je však limitováno časem. Doba do uzavření výsledku je podmíněna pomalým růstem MTB a konečný výsledek je možno poskytnout minimálně za 10 dnů od záchytu kmene na kultivačních médiích.

Standardní léčebný režim je (či měl by být) u pacienta zaveden okamžitě po potvrzení diagnózy (klinické, laboratorní – pozitivní mikroskopické – kultivační vyšetření), nebo před při vysoké suspekci a přítomnosti typických znaků. Účinnost terapie zvláště kombinací Isoniazidu (INH) a Rifampicinu (RIF) je vysoká a několik dnů po podání AT dochází u standardních případů k významné redukci životaschopných mykobakterií a zlepšení stavu pacienta.

Nestandardní případy představují infekce kmene rezistentními na jeden z léků základní řady – monorezistentní, kombinaci INH a RIF – multirezistentní, rezistentní na 3 a více léků - extrémně, totálně rezistentní. Nejčastěji se v ČR a také naši laboratoři setkáváme s kmeny mono či multirezistentními, nyní však evidujeme také dvě onemocnění vyvolaná kmeny extrémně rezistentními. Jednalo se o cizince z východní Evropy a občana ČR s pozitivní cestovatelskou anamnézou.

Léčba rezistentní tuberkulózy vyžaduje speciální režim, který je schopno zajistit pouze specializované pracoviště. Požadavek na výsledek nastavbových vyšetření je tedy urgentní, z důvodů potřeby cílené péče o pacienta. V současné době jsou dostupné testy umožňující rychlou detekci rezistencí u kultivovaných kmenů, tyto testy již má naše laboratoř k dispozici.

Testy na principu molekulárně biologické detekce mutací genů podmiňující rezistenci jsme schopni provést do několika hodin od záchytu kmene (max. 24). Poskytují poměrně

významný orientační výsledek. Srovnávací vyšetření s klasickými testy dosud potvrdila vysokou spolehlivost detekce rezistencí na INH a RIF a praktickou využitelnost.

Vhodná indikace: Výše zmiňované rizikové skupiny, především cizinci, bezdomovci a pacienti s recidivou onemocnění, kteří byli v minulosti na TB léčeni. Požadavek na vyšetření je možno provést po telefonické domluvě s laboratoří.

### Mykobakteriózy

Problematika, která začíná vyvstávat v souvislosti s celkovým vzrůstem prevalence civilizačních chorob, systémových a imunitních poruch (jak vrozených tak získaných). V populacích industriálně a socioekonomicky zatížených oblastí České republiky (zvláště Moravskoslezský a Ústecký kraj) je dlouhodobě evidována vysoká míra postižení dýchací soustavy, malignit a onemocnění souvisejících s životním stylem. Zmíněné faktory významně ovlivňují také uplatnění fakultativně patogenních mikroorganismů při onemocnění člověka. Prevalence a především význam rizikových faktorů viz schéma níže:

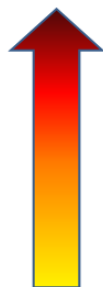
### Identifikace, interpretace nálezů netuberkulózních, podmíněně patogenních mykobakterií (PPM)

S rozvojem nových molekulárně biologických metod jsme schopni identifikovat téměř všechny dosud popsané druhy mykobakterií. Význam sekvenčních analýz a hybridizačních technik spočívá v rychlosti získání výsledku. Se současným vybavením jsme schopni přesnou identifikaci kmene provést do několika hodin po zjištění pozitivní kultivace. Vzhledem k obecně velmi dlouhé kultivační době většiny mykobakteriálních druhů, jsou urychlení a přesnost identifikace zásadní a velmi přínosné. Identifikace běžnějších druhů mykobakterií nyní provádíme pomocí PCR (polymerase chain reaction) s vyhodnocením reversní hybridizací, méně obvyklé druhy jsou typizovány pomocí sekvenční analýzy.

Podrobná identifikace přes svůj význam, však přináší komplikace při interpretaci nálezu méně obvyklých, nebo nově zachycených druhů. Současné standardy (ATS, BTS), které byly přijaty také u nás, přinášejí informace o diagnostice a léčbě obvykle se vyskytujících druhů s potvrzeným klinickým významem. Nicméně ani tyto nejsou v plné míře využitelné a všeobecně aplikovatelné. Přispívává k tomu stále pokračující vývoj a výzkum v oblasti interakce mykobakterií a lidského organismu a mnoho z problematiky není dosud uspokojivě vysvětleno. Stejně jako vývoj v systematice,

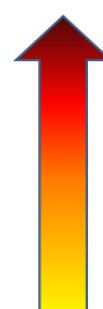
## Prevalence rizikových faktorů

- Kombinace!
- Pneumokonioza, CHOPN
- Prodělaná tuberkulóza!
- Alkoholismus, životní styl
- Věk (>40, <12), pohlaví
- Diabetes, HIV



## Význam rizikových faktorů

- Diabetes, HIV
- Kombinace!
- Věk (>40, <8), pohlaví
- Prodělaná tuberkulóza !
- Pneumokonioza, CHOPN
- Alkoholismus, životní styl



kdy dochází prakticky každoročně k popisu dalších nových druhů. Z hlediska klinického významu a frekvence záchytu z klinického materiálu a prostředí je možno mykobakteri-

ální druhy rozdělit do několika skupin. Analýza situace dle záchytu v naší laboratoři, procentuální podíl izolovaných kmenů při potvrzeném onemocnění (za období 2000-2012):

<p><b>Druhy běžně se vyskytující – často izolované-značně klinicky významné:</b>  Faktor predispozice nízký – infekce možná u imunokompetentních jedinců:  <i>Mycobacterium marinum</i> – klinický význam 100%  <i>Mycobacterium kansasii</i> – klinický význam 90%  <i>Mycobacterium avium</i> – klinický význam 50%ssp. <i>hominisuis</i></p> <p><b>Druhy běžně se vyskytující často izolované klinicky významné:</b>  Faktor predispozice vysoký – infekce <b>převážně</b> u imunokompromitovaných, predisponovaných <i>Mycobacterium xenopi</i> – klinický význam – 20%  <i>Mycobacterium intracellulare</i> – klinický význam – 10%  <i>Mycobacterium abscessus</i> – klinický význam – 1%  <i>Mycobacterium chelonae</i> – klinický význam – 1%  <i>Mycobacterium mucogenicum</i> – klinický význam – 1%  <i>Mycobacterium celatum</i> – klinický význam – 1%  <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> – klinický význam – 1%  Ostatní <i>Mycobacterium avium</i> komplex (<i>M.marseillense</i>)</p>	<p><b>Druhy vzácně se vyskytující ojedinele izolované-značně klinicky významné:</b>  Faktor predispozice nízký – infekce možná u imunokompetentních jedinců:  <i>Mycobacterium malmoense</i> – klinický význam 100%  <i>Mycobacterium vulneris</i> – klinický význam 100%  <i>Mycobacterium haemophilum</i> – klinický význam 100%</p> <p><b>Druhy běžně se vyskytující, klinický význam zásadně podmíněný:</b>  Faktor predispozice velmi vysoký – infekce téměř <b>výhradně</b> u imunokompromitovaných  <i>Mycobacterium fortuitum</i>  <i>Mycobacterium lentiflavum</i>  <i>Mycobacterium arupense</i>  Ostatní <i>Mycobacterium terrae</i>-komplex (<i>M.terrae</i>, <i>M.nonchromogenicum</i>, <i>M.triviale</i>)  <i>Mycobacterium smegmatis</i>  <i>Mycobacterium gordonae</i></p> <p><b>Druhy běžně v prostředí, saprofytické, klinický význam zásadně podmíněný, nebo bez:</b>  <i>M.fortuitum</i> komplex – <i>M.peregrinum</i>, <i>M.septicum</i>, <i>M.goodii</i>  <i>M.parafortuitum</i> komplex – <i>M.neoaurum</i>, <i>M.aurum</i>, <i>M.obuense</i>, <i>M.tokaiense</i>, <i>M.chlorophenicum</i></p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Definitivní diagnostický závěr může být učiněn pouze na základě **kombinace mnoha informací**. V úvahu je nutno brát vlastnosti konkrétního druhu (kmene), a míru schopnosti vyvolat onemocnění. Vzhledem ke kosmopolitnímu rozšíření většiny druhů mykobakterií ve vnějším prostředí je nutno veškeré záchyty hodnotit kriticky, jelikož kultivační průkaz nemusí vždy představovat infekci! Tento fakt je určující při rozhodnutí o nasazení terapie, která může v mnoha ohledech přinášet nižší benefit a představovat pro pacienta zbytečnou zátěž, na druhou stranu prodlení adekvátní terapie může mít pro pacienta závažné následky.

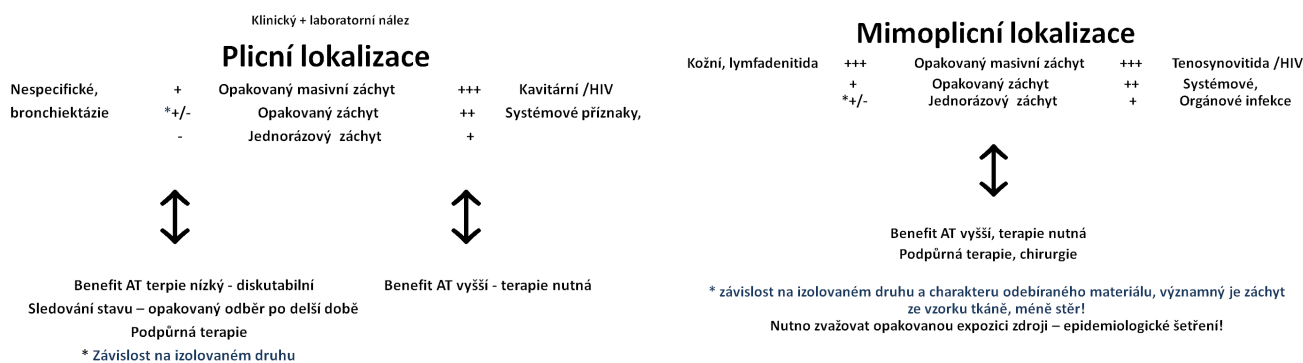
Rozhodující při hodnocení významu kultivačního nálezu je aktuální stav, klinický nález a anamnéza. Zásadní je dodržení preanalytické fáze, dbát na správnost odběru. Určující je také typ odebíraného materiálu. Vyšší výpovědní a mnohdy určující hodnotu má vyšetření invazivně odebraného vzor-

ku. Tkáň získaná biopsií, nebo punkce z místa postižení je vhodnější než odběr provedený na tampony, proto tam, kde tomu nebrání jiné okolnosti, nebo je to vzhledem ke stavu pacienta žádoucí, měl by být takovýto odběr preferován. Pokud je k dispozici vzorek tkáně, je vhodné, mimo patologické vyšetření, část vždy zaslat také na kultivaci!

Při odběrech vzorků primárně nesterilních např. sputum, nebo moč, je nutno dbát na dodržení správnosti odběru. Odběr sputa provádět ráno nalačno, pacient nesmí jíst, pít, kouřit a vyplachovat si ústa vodou z vodovodu! (možnost kontaminace vzorku podmíněně patogenními mykobakterií, která mohou být ve vodě přítomna). CHOPN, pneumokonioza - stavy s velmi častou izolací mykobakterií, rozhodnutí o adekvátní terapii je vždy podmíněno aktuálním stavem pacienta a přítomností konkrétních druhů dle výše uvedeného významu.

- **Kolonizace** CF, Pneumokonioza, CHOPN  
Akutní projevy, mírný průběh  
Pomnožení, hypersenzitivita – pneumonitis → Exacerbace?
- **Infekce**  
Chronické projevy  
CT+, RTG+, změny, systémové příznaky

## Možnosti kumulativní interpretace kultivačního záchytu mykobakterií a klinického nálezu



+++ terapii nutno zahájit

++ terapii je vhodné zahájit, provést dodatečná vyšetření

+ terapii uvážit, zahájit po vyloučení jiné etiologie

- terapie není nutná, sledování pacienta, provést další vyšetření

Cílem sdělení není vyčerpávající přehled, který by při dané problematice vydal na samostatnou publikaci, také s ohledem na skutečnost, že v současnosti je již několik velmi hodnotných zahraničních kompendií k dispozici. Snahou bylo přiblížit současné možnosti vyšetření, oživit zájem o pro-

blematiku, připomenout základní doporučení pro odběr materiálu a nastínit určité vodítko k rozhodování o osudu pacientů. Významná však bude vždy vzájemná komunikace a pomoc ošetřujícího lékaře a laboratoře.

#### Literatura:

De Groote, M.A and Huitt, G.: Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria; Clinical Infectious Diseases 2006; 42:1756–63

Griffith, D. E., Aksomit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M. F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., von Reyn, C. F., Wallace, Jr. R. J., and Winthrop K., on behalf of the ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. American Journal of Respiratory Critical Care Medicine 175:367-416.

Kazda, J. Pavlík, I., Falkinham, J. O., Hruška, K.: *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animals and Humans Health*. Springer, 2009. 520 s. ISBN 978-1-4020-9412-5.

Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. Thorax 2000;55:210–8.

Tuberkulóza a respirační nemoci 2000-2012. Zdravotnická statistika: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, <http://www.uzis.cz/>

<http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>

## Možnosti diagnostiky chlamydiových infekcí

Romana Mašková, Hana Bílková Fránková, Jana Doležilková

V současné době jsou chlamydiové infekce velmi diskutovaným tématem. Z tohoto důvodu bychom Vás rádi seznámili s možnostmi jejich diagnostiky v našich laboratořích.

Chlamydie patří mezi nepohyblivé, intracelulární, gram negativní bakterie. Jde o energetické parazity, kteří jsou metabolicky závislí na hostitelské buňce. Typický je pro ně dvoufázový vývojový cyklus, kdy infekční, metabolicky neaktivní elementární tělísko přilne k povrchu vnímavé buňky a následně je fagocytováno dovnitř buňky, kde se mění v aktivní retikulární tělísko, které se dále množí. Zhruba po 48 až 72 hodinách dojde k prasknutí hostitelské buňky a rozsevu infekčních elementárních tělísek do organismu.

Chlamydie se řadí do čeledi Chlamydiaceae, rozeznáváme dva rody.

Rod *Chlamydia* s druhy *Ch. trachomatis*, *Ch. muridarum* a *Ch. suis* a rod *Chlamydophila* s druhy *Ch. pneumoniae*, *Ch. psittaci*, *Ch. pecorum*, *Ch. abortus*, *Ch. caviae* a *Ch. felis*.

Pro humánní medicínu jsou klinicky významné druhy *Chlamydia trachomatis* postihující urogenitální trakt a oči, *Chlamydophila pneumoniae* a *psittaci*, které mají afinitu primárně k respiračnímu traktu.

V poslední době je zkoumán vztah chlamydií i k jiným závažným onemocněním (reaktivní artritida, ateroskleróza, onemocnění CNS a další).

### Diagnostika *Chlamydia sp.*

Kromě ELISA metod, kdy vyšetřujeme protilátky proti druhově specifickému antigenu (MOMP) nabízíme i serologickou metodu ELISA Chlamydií IgA, IgM a IgG, kde se vyšetřují protilátky proti rodově specifickému LPS antigenu.

LPS je lipopolysacharid, společný pro všechny chlamydie a protilátky proti němu se vytvářejí dříve než protilátky proti druhově specifickému MOMP. Tudíž tyto testy je nejlépe využívat k diagnostice rané infekce.

Následně, dle kliniky, doporučujeme využití níže uvedených souprav pro diagnostiku jednotlivých druhů chlamydií.

### Diagnostika *Chlamydia trachomatis*

Pro diagnostiku akutních infekcí se doporučuje přímý průkaz antigenu

1. metodou **Hybridizace DNA**, genová sonda se provádí z výtěrů z cervixu, uretry, spojivkového vaku
2. metodou **PCR**, kdy průkaz přítomnosti DNA provádíme z moči, výtěrů, punktátů i jiných tělních tekutin

Pro detekci chronických aktivních onemocnění (RA, infertilita, záněty pánve) nebo dříve nediagnostikovaných infekcí, kde již není možný přímý průkaz infekčního agens, pak nabízíme serologickou diagnostiku metodou ELISA

pro průkaz protilátek ve třídě IgA a IgG. Druhým krokem pak je konfirmační metoda **Imunoblotu**, která je založena na detekci protilátek proti jednotlivě separovaným, druhově specifickým antigenům a slouží ke konfirmaci serologicky pozitivních hladin. Provádí se opět ve třídách IgA a IgG.

Pro chronická onemocnění je signifikantní detekce protilátek proti heat shock proteinům Hsp 60, Hsp 70.

Výskyt protilátek proti Hsp 60 je často spojován s infertilitou a potraty, výskyt protilátek proti 57 kD pak s reaktivní artritidou.

### Diagnostika *Chlamydophila pneumoniae*

Zde je hlavní vyšetřovací metodou serologické vyšetření **ELISA**, pro průkaz protilátek proti druhově specifickým antigenům ve třídě IgA, IgM, a IgG.

Přítomnost protilátek ve třídě IgM je typická pro rannou fázi infekce a pokud nejsou přítomny protilátky ve třídě IgA a IgG, můžeme tento stav považovat za primoinfekci.

IgA se vytvářejí později, lze je považovat za ukazatel aktivní infekce, často i reinfekce.

U některých jedinců zůstávají dlouhodobě pozitivní, i když se nejedná o aktivní infekci či reinfekci.

U protilátek třídy IgG je samotná pozitivita bez známek onemocnění považována za prodělanou infekci. Za známky aktivní infekce můžeme považovat buď čtyřnásobný vzestup protilátek IgG po 3 týdnech nebo v samotném odběru velmi vysoký index pozitivity. Důležité je však si uvědomit, že protilátky proti chlamydiím mohou dlouhodobě perzistovat (měsíce až roky) a nemusí znamenat aktivní infekci!!!

Obdobně jako u *Chlamydia trachomatis* i zde u serologicky pozitivních výsledků nabízíme jako druhý diagnostický krok konfirmaci metodou **Imunoblot** ve třídě IgA, IgM a IgG.

IgA protilátky stanovené blotem mohou naznačovat chronickou pneumonii, diskutován je také vztah s rizikem srdečního infarktu.

Protilátky proti antigenům 54kD, 35kD a Hsp 60 často ukazují na vysoké riziko aterosklerózy.

Hsp 60 (Heat shock protein) je antigenem nespecifickým, ale významný pro rozpoznání chronických stadií onemocnění.

### Diagnostika *Chlamydophila psittaci*

Jedná se o antropozoonózu, v našich podmínkách poměrně vzácnou, buď importovanou nebo profesní nákazu chovatelů exotického ptactva. Člověk se může nakazit po vdechnutí kontaminovaného prachu ptačím trusem. Nákaza podléhá hlášení.

Provádíme průkaz protilátek ze séra metodou mikroimunofluorescence (MIF) ve třídách IgM, IgA, IgG. Vždy je potřeba provést opakovaný odběr za 2-3 týdny k posouzení dynamiky titrů. V případě serologické positivity je možno provést confirmaci blotem.

#### Závěr:

- vybrat vhodnou diagnostickou metodu
- u vyhodnocování všech serologických metod je nutné vždy posuzovat dynamiku a výši stanovených titrů
- při zvažování terapie posuzovat laboratorní výsledky v kontextu s klinickými příznaky

## 4. pracovní konference zdravotních laborantů a zdravotních sester

*Miroslava Topínková*

V přednáškovém sále Domova sester Fakultní nemocnice Ostrava se 30. října 2012 konala již 4. pracovní konference zdravotních laborantů a zdravotních sester. Znovu byl o akci nebývalý zájem, což potvrzuje i počet účastníků – 130.

Přednášky byly rozděleny do dvou bloků – aktuální problematika mykobakterií a patogenních *Escherichia coli*. Byly zde prezentovány zajímavé kazuistiky z pohledu klinických pracovišť, Ústavu patologie Fakultní nemocnice, laboratoří Zdravotního ústavu a epidemiologů z Krajských hygienických stanic Ostrava a Zlín.

Ráda bych tímto poděkovala všem přednášejícím za zajímavé a odborně vysoce cenné příspěvky, paní náměstkyni Bc. Márii Dobešové a vedoucí laborantce Ústavu patologie

Mgr. Janě Vaculové za obrovskou podporu a spolupráci a pracovníkům Zdravotního ústavu za pomoc s organizací.

Jsme velmi rádi, že se konference stala velmi dobrou a žádanou tradicí a že Vás můžeme pozvat na konferenci příští, která se uskuteční 29.5.2013.





# NABÍDKA

## ODBĚRY KRVE A BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

[www.zuova.cz](http://www.zuova.cz)

Tyto odběry zajišťuje na Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě imunologická a alergologická ambulance.

**Standardní doba pro laboratorní odběry je ráno od 6:30 – 8:00 hod.,** odběry lze také provést v průběhu ordinační doby ambulance. Na odběry je možné se předem telefonicky domluvit: 596 200 157, 596 200 145.  
Odběry se provádějí nalačno!

**Výtěry pro přípravu autovakcín v úterý 6:30 – 8:00 hod.**

### Ordinační hodiny ambulance:

Pondělí	7:00 - 12:00	
Úterý	7:00 - 12:00	13:00 - 14:30
Středa	7:00 - 12:00	13:00 - 14:30
Čtvrtek	7:00 - 12:00	13:00 - 14:30
Pátek	7:00 - 12:00	

### Kontaktní osoby:

MUDr. Vítězslav Novák  
596 200 250, 157  
[vitezslav.novak@zuova.cz](mailto:vitezslav.novak@zuova.cz)

MUDr. Táňa Balnerová  
596 200 230, 145  
[tana.balnerova@zuova.cz](mailto:tana.balnerova@zuova.cz)

## Rozpis služeb v době vánočních svátků

Pracoviště Ostrava	Pracoviště Havířov
22.12. 6:00-14:30	22.12. 6:00-14:30
23.12. 8:00-13:30	23.12. 6:00-14:00
24.12. 6:00-14:30	24.12. 7:00-11:30
25.12. 8:00-13:30	25.12. 6:00-14:30
26.12. 6:00-14:30	26.12. 7:00-11:30
27.12. 6:00-17:00	1.1. 7:00-11:30
28.12. 6:00-17:00	
29.12. 6:00-14:30	
30.12. 8:00-13:30	
31.12. 6:00-17:00	
1.1. 8:00-13:30	

### Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Partyzánské nám. 7, 702 00 Ostrava,  
tel.: 596 200 111, e-mail: podatelna@zuova.cz

### Redakční rada:

Mgr. Hana Fránková Bílková, RNDr. Ivo Lochman, Ing. Pavel Jurčík, MVDr. Romana Mašková

Tisk: Kartis + Co s.r.o., Náklad: 1 500 výtisků

[www.zuova.cz](http://www.zuova.cz)

