



ZPRAVODAJ

CENTRA KLINICKÝCH LABORATOŘÍ

Vážené kolegyně, Vážení kolegové, milí přátelé,

děkuji Vám za spolupráci v uplynulém roce a do nového roku přeji hodně štěstí, zdraví, osobních i pracovních úspěchů.

RNDr. Petr Hapala,
ředitel Zdravotního ústavu Ostrava



Obsah

Zkušenosti s laboratorní diagnostikou sezónních respiračních nákaz v sezóně 2012–2013	3
Nové možnosti PCR detekce Mycobacterium tuberculosis ve vzorcích klinického materiálu se současným stanovením INH-RIF rezistence	5
Doporučení pro laboratorní diagnostiku dávivého kašle	6
Rozšíření metod pro testování biocidní účinnosti dezinfekčních přípravků	7
Novinky v praktickém využití měření hladin protilátek, imunoglobulinů třídy IgA, IgG a IgM proti Aspergillus fumigatus	8
Aktuální informace k rutinní identifikaci bakterií metodou MALDI-TOF MS	9
Calprotectin, marker pro diagnostiku nespecifických střevních zánětů (IBD)	9
Rozpis služeb v době vánočních svátků	11

Zkušenosti s laboratorní diagnostikou sezónních respiračních nákaz v sezóně 2012–2013

Jakub Mrázek, Hana Zelená

Úvod

Sezónní respirační nákazy jsou způsobovány především vysoce infekčními viry šířícími se vzduchem nesenými kapénkami (chřipka typu A, B, C, respirační syncytiální virus A, B, parainfluenza, rinoviry, koronaviry, adenoviry, v menší míře enteroviry a herpetické viry), ale také některými bakteriálními původci (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*). K jejich šíření dochází typicky v chladných měsících. Výskyt respiračních nákaz stoupá od podzimu, vrcholí obvykle kolem Vánoc a na začátku nového roku. Jejich vyšší výskyt se udržuje až do příchodu jara. Podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou ze všech celosvětově sledovaných infekcí respirační nákazy v úmrtnosti na prvním místě. Celosvětově chřipkou ročně onemocní až jedna miliarda lidí, u 3–5 milionů pacientů pak bývá těžký průběh onemocnění, přičemž 300–500 000 osob nemoci podlehnou.

Molekulárně biologická diagnostika chřipky

Laboratoře Zdravotního ústavu v Ostravě provádí komplexní laboratorní diagnostiku chřipky, která se opírá především o průkaz tohoto viru metodou real-time PCR. Kromě průkazu RNA viru metodou PCR se provádí také klasická viro-

logická diagnostika zahrnující kultivaci viru na buněčných kulturách MDCK, hemaglutinační test pro průkaz agens a průkaz protilátek ELISA testem a komplementfixační reakcí, případně elektronová mikroskopie.

Od října 2012 do května 2013 bylo v naší laboratoři vyšetřeno 1391 vzorků a zjištěno metodou PCR 431 případů infekce virem chřipky A, z toho 272 případů chřipky A(H1N1pdm2009) a 165 případů chřipky A(H3N2). Ve čtyřech případech se jednalo o smíšenou infekci virem A(H1N1pdm2009) a H3N2. V 150 případech byl pomocí PCR prokázán virus chřipky B, z toho ve třech případech šlo o koinfekci virem chřipky A(2x H1N1pdm2009 a 1x H3N2) i B.

V souvislosti s chřipkou bylo u námi vyšetřených pacientů zaznamenáno celkem 16 úmrtí.

Chřipková sezóna 2012/2013 byla charakteristická cirkulací jak chřipky typu A (subtypy H1N1pdm2009 a H3N2) tak i typu B. Kulminace byla protrahovaná v měsících leden až březen, přičemž nejprve kulminovala incidence chřipky A(H1N1pdm2009), poté A(H3N2) a následně chřipky typu B.

Tab. 1. Počet infekcí virem chřipky v sezóně 2012/2013 prokázaných metodou real-time PCR

	X / 12	XI / 12	XII / 12	I / 13	II / 13	III / 13	IV / 13	V / 13	celkem
Infl A	0	0	0	115	250	59	7	0	431
H1N1pdm09	0	0	0	97	149	26	0		272
H3N2	0	0	0	19	104	35	7	0	165
neurčeno	0	0	0	0	2	0	0	0	2
z toho směs	0	0	0	1	5	2	0	0	8
Infl B	0	0	1	10	55	90	33	1	189
celkem	0	0	1	125	305	149	40	1	620

Tab. 2. Počet metodou real-time PCR prokázaných smíšených respiračních infekcí v sezóně 2012/2013

kombinace agens	počet pacientů
H1N1pdm09 + H3N2	4
H1N1pdm09 + B	1
H3N2 + B	3

Sérologická diagnostika respiračních virových nákaz a *Mycoplasma pneumoniae* (MP)

Sérologická diagnostika akutních virových respiračních infekcí a MP je založena na průkazu specifických protilátek v séru. V současné době je na virologickém oddělení CKL ZÚ zavedena sérologická diagnostika těchto infekcí: influenza A (Infl A), influenza B (Infl B), parainfluenza (PIV),

adenovirus (ADV), RS virus (RSV) a *M. pneumoniae* (MP). K průkazu protilátek se používá komplementfixační reakce (KFR) u všech uvedených agens. Jednoznačným průkazem akutní infekce je sérokonverze nebo minimálně 4-násobný vzestup titru protilátek v párových sérech v KFR. Hodnoty KFR titru ≥ 128 (u MP ≥ 64) již v prvním vzorku jsou považovány za pravděpodobný průkaz recentní infekce. U infekcí ADV, RSV a MP se provádí rovněž průkaz protilátek IgG, IgM a IgA metodou ELISA. V případě positivity IgM nebo IgA společně s IgG se jedná o pravděpodobnou recentní infekci.

Počet prokázaných případů akutních respiračních infekcí sérologickými metodami (KFR a ELISA) v jednotlivých měsících v sezóně 2012/2013 je uveden v tabulce 3.

Tab. 3. Počet akutních respiračních infekcí v sezóně 2012/2013 prokázaných sérologicky

	X / 12	XI / 12	XII / 12	I / 13	II / 13	III / 13	IV / 13	V / 13	celkem
Infl A	0	0	0	21	34	18	3	2	78
Infl B	0	1	1	7	8	16	22	9	64
PIV	0	2	1	8	6	3	1	4	25
ADV	0	1	1	34	65	40	20	14	175
RSV	0	3	4	25	37	20	8	7	104
MP	18	40	13	70	78	65	49	50	383
celkem	18	47	20	165	228	162	103	86	829

Z uvedeného vyplývá, že nejvyšší počet akutních respiračních infekcí připadá na měsíc únor a nejčastěji prokázaným agens je *M. pneumoniae*. Je zde také patrný vyšší počet pozitivních výsledků u těch agens, u kterých se vedle KFR využívá rovněž metody ELISA, patrně z důvodu pozdějšího vzestupu titru KFR. Párové vzorky jsou zasílány pouze

v menším počtu případů, a proto samotná KFR v prvním vzorku nemůže vždy akutní infekci prokázat.

V 66 případech byly sérologicky prokázány smíšené respirační infekce. U 59 pacientů se jednalo o duální infekci a u 7 dokonce o kombinaci 3 různých agens. (Tabulka 4).

Tab. 4. Počet sérologicky prokázaných smíšených respiračních infekcí v sezóně 2012/2013

kombinace agens	počet pacientů	kombinace agens	počet pacientů
ADV + RSV	19	Infl B + MP	1
ADV + MP	17	PIV + ADV	1
Infl A + RSV	7	PIV+ RSV	1
Infl A + ADV	5	ADV + RSV + MP	5
RSV + MP	5	Infl B + ADV + RSV	1
Infl A + MP	2	Infl B + PIV + MP	1
Infl B + RSV	1	Celkem	66

Závěr:

PCR průkaz chřipkových virů nabízí rychlou, citlivou a spolehlivou diagnostiku, jedná se však o poměrně náročné a drahé vyšetření, které je vhodné využívat jen u pacientů se závažným průběhem respirační infekce. Sérologické metody umožňují diagnostikovat širší spektrum původců akutních respiračních infekcí, díky tomu lze odhalit i smíšené infekce, které se často vyznačují závažnějším průběhem. Vzhledem k ceně je tato diagnostika dostupnější než přímá diagnostika metodou PCR. Je třeba přihlížet k opožděné tvorbě protilátek, z toho důvodu je vhodnější vyšetřovat párové vzorky sér.

Doporučený postup při odběru klinického materiálu pro vyšetření na přítomnost chřipky a dalších respiračních virů

Výtěr provádějte nejlépe ráno nalačno, bez předchozího používání kloktadel a jiných dezinficií. Pacienta před vý-

těrem necháme zakašlat. Jedním vatovým tamponem provedeme stěr zadní stěny nosohltanu krouživým pohybem tak, aby se setřelo co nejvíce epiteliálních buněk. Je nutné se vyhnout mandlím! Tampon vložíme do virologického odběrového média a asi uprostřed špejli zalomíme o okraj zkumavky. Druhým tamponem vytřeme obě nosní dírky a špejli opět zalomíme o okraj téže zkumavky (co možná nejmenší naředění výtěru). Výtěr v odběrovém médiu ihned uložíme do chladničky (+2 až +8 °C). Materiál se nesmí zmrazit! Nutno co nejrychleji transportovat do virologické laboratoře.

Odběrové médium se uchovává v mrazničce při teplotě -20 ± 5 °C. Před odběrem je nutné médium rozmrazit tak, aby před použitím neobsahovalo kousky ledu.

Odběrové soupravy je možno objednat na telefonním čísle 596 200 316.

Nové možnosti PCR detekce *Mycobacterium tuberculosis* ve vzorcích klinického materiálu se současným stanovením INH-RIF rezistence.

Vít Ulmann, Eva Kalakayová, Anna Kubínová

Molekulárně biologická diagnostika tuberkulózy (TB) je na pracovišti laboratoře pro diagnostiku mykobakterií Zdravotního ústavu v Ostravě prováděna již 15 let. Od prvních kroků průkazu původce tuberkulózy technikou málo přesné ligázové řetězové reakce (LCR), byl učiněn významný pokrok. Současné metody se vyznačují mnohem vyšší spolehlivostí a přesností stanovení v klinickém vzorku pacienta. V letošním roce jsme ověřili a zavádíme do praxe diagnostiku založenou na principu Real-Time, multiplex (umožňující detekci více parametrů) polymerázové řetězové reakce. Významným přínosem metody, zejména při mikroskopicky pozitivním vyšetření sputa pacienta je rychlé a přesné odlišení klasické tuberkulózy od perzistence, nebo infekce netuberkulózními mykobakteriemi (NTM). Naopak potvrzení NTM ve vzorcích, kde je jejich přítomnost předpokládána (např. susp. kožní mykobakteriáza).

Ověřená citlivost (senzitivita) vyšetření pro MTB dosahuje souhrnně 92 % u všech typů klinických vzorků a přesnost detekce (specifita) téměř 100 %.

Ve vzorcích s potvrzenou přítomností DNA *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) je bezprostředně možno stanovit mutace v genomu MTB podmiňujících rezistenci na isoniazid a rifampicin. Takto lze dříve před kultivací kmene a klasickým stanovením profilu rezistence kmene poskytnout orientační výsledek multi- nebo monorezistence, který může být podkladem pro následnou terapii nebo její modifikaci. Detekce rezistencí je prováděna rovněž z kultury kmene (metabolické nebo klasické), významně dříve, než je uzavřeno standardní vyšetření mikrodiluční metodou (MIC).

Obecně lze doporučit PCR u mikroskopicky pozitivních vzorků, kdy při hlášení výsledků mikroskopie je možno dohodnout dovyšetření. Dále je vhodné automaticky požadovat molekulárně biologické vyšetření u klinických vzorků, které jsou odebírány invazivně nebo je odběr neopakovatelný (biopsie, punkce, bronchoalveolární tekutiny a laváže, likvor). Pro běžný screening (potřeba vyloučení TB u kontaktů nebo při nespecifickém postižení) není molekulárně biologické vyšetření vhodné.

Pro svou vysokou specifitu lze však uplatnit při vyšetřování HIV pozitivních pacientů a dětí.

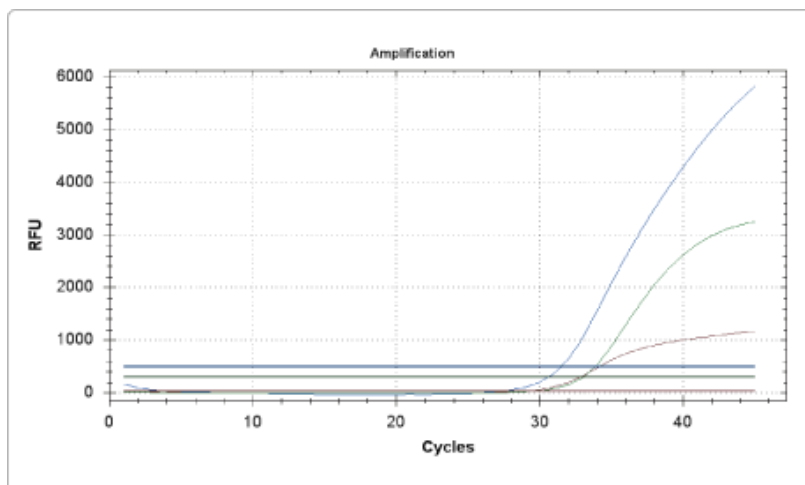
PCR metody nejsou vhodné pro vyšetření vzorků stolice a krve. Moč doporučujeme vyšetřit pouze při podezření na TB urogenitálního traktu.

Detekci rezistence na INH a RIF je optimální provést u PCR pozitivních vzorků pacientů rizikových skupin, zejména cizinců ze zemí s vysokou prevalencí rezistentní TB. V případě kultivačně potvrzených recidiv u dříve léčených, resp. pacientů v léčbě, kdy nedochází k regresi náleží, provedeme detekci rezistencí z kmene dříve, než je uzavřeno standardní stanovení MIC.

Vhodnost využití molekulárně biologických vyšetření budeme ochotně konzultovat, stejně tak charakter, množství, možnosti odběru a transportu klinického materiálu.

Vyšetření lze provést dodatečně až do 5 dnů od obdržení vzorku, po tuto dobu je vzorek v laboratoři uchováván.

Strojový výstup výsledku amplifikace pozitivního vzorku



Mycobacterium tuberculosis Z-N 1000x



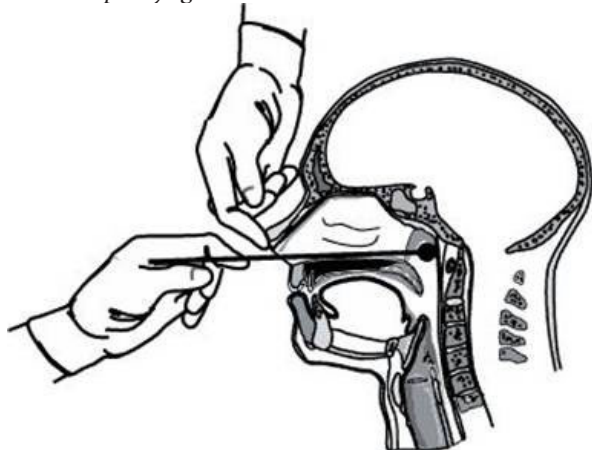
Doporučení pro laboratorní diagnostiku dávivého kašle

Iveta Popelková, Andrea Holečková, Alena Kloudová, Jana Motlochová

Pertuse (dávivý kašel) patří v ČR mezi povinně hlášená a dlouhodobě sledovaná onemocnění. Podle údajů WHO postihne dávivý kašel každoročně odhadem 20–40 milionů osob, z nichž 200–300 tisíc osob onemocnění podlehnou. Od 90. let minulého století došlo k posunu věkových kategorií nemocných, kde nejvíce postiženi jsou adolescenti a dospělí. Do roku 2012 byla největší incidence případů registrována ve věku 10–14, v roce 2012 došlo k posunu do věkové skupiny 15–19 letých.

Bordetella pertussis je aerobní gramnegativní kokobacil, který je citlivý na zevní prostředí. Bordetely nemají žádný přirozený rezervoár, jedná se o výlučně lidský patogen. Infekce se přenáší kapénkami infekčního aerosolu. Onemocnění probíhá ve třech stádiích. Nejvíce infekční je člověk v prvním neboli katarálním stádiu onemocnění, v prvních dvou týdnech od začátku kašle. Délka vylučování závisí na věku, imunitě a antibiotické léčbě. Po vstupu do organismu se bordetely pomnožují a osídlují řasinkový epitel dýchacích cest, kde způsobují zánět až nekrózu epitelu sliznic.

Obr. 1 Nazofaryngeální odběr



Kultivační průkaz *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* je stále považován za zlatý standard. Výhoda kultivačního vyšetření je získání kmene, který je cenným zdrojem epidemiologických informací a určení antibiotické citlivosti. Při podezření na infekci je nutné předem telefonicky informovat mikrobiologickou laboratoř, aby mohla být připravena Bordet–Gengouva půda s glycerol-bramborovým extraktem a příměsí 25 až 30% beraní krve. Na průvodku je nutno zřetelně označit cílené vyšetření na pertusi!

Odběr materiálu se provádí ráno nalačno bez ústní hygieny výtěrem z nasopharyngu tamponem na drátku v Amies transportním médiu s aktivním uhlím (Obr. 1, 2). Odběrová souprava je lékařům dodávána zdarma. Odebraný materiál

Obr. 2 Odběrová souprava určená ke kultivačnímu vyšetření



je nutné transportovat do laboratoře co nejdříve, nejpozději však do 24hodin od odběru. Materiál se uchovává při pokojové teplotě.

Citlivější metodou laboratorního průkazu bordetel je průkaz DNA *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* metodou real-time PCR, které je možné provádět rovněž z materiálu získaného nasofaryngeálním výtěrem. Odběrová souprava, která je lékařům distribuována zdarma, obsahuje flexibilní tampón s dakronovým vláknem (Copan) + odběrové médium (eSwab, Copan) (Obr. 3).

Ze sérologických vyšetření nabízejí laboratoře odd. imunologie a alergologie stanovení IgG a IgA protilátek proti pertusovému toxinu metodou ELISA a také vyšetření protilátek proti *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* aglutinační metodou.

K diagnostice onemocnění se odebírají dva vzorky srážlivé krve. První vzorek co nejdříve při podezření na onemocnění pertusi a druhý vzorek nejdříve za 3–4 týdny.

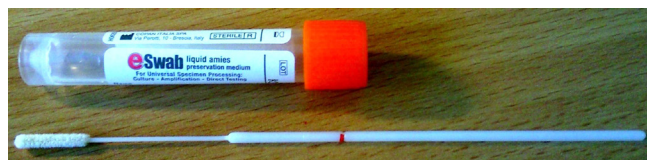
Podle posledních studií je doporučováno vyšetřovat protilátky proti pertusovému toxinu (PT) ve třídě IgG, případně IgA. Z výsledků získaných stanovením PT nelze odlišit, zda se jedná o protilátky získané očkováním nebo po prodělané infekci. Pokud byl pacient očkován acelulární vakcínou, lze vysoké hladiny protilátek ve třídě IgG vztáhnout k prodělané infekci pertusi tehdy, když vakcinace neproběhla v posledních 12 měsících.

Při sérologickém vyšetření protilátek proti *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* metodou aglutinace jsou prokázány celkové protilátky. Pro potvrzení diagnózy je signifikantní čtyřnásobný nárůst nebo pokles titru protilátek v párových vzorcích. Pokud nedojde minimálně k čtyřnásobnému zvýšení (poklesu) titru protilátek v párových vzorcích, tak se s velkou pravděpodobností jedná o anamnestické hladiny protilátek které mohou být získány po dříve prodělaném onemocnění nebo po očkování celobuněčnou vakcínou v minulosti.

V ČR podléhá pertuse povinnému hlášení. V Národní referenční laboratoři pro pertusi a diftérii je vedena sbírka kmenů, která je cenným zdrojem informací o kmenech vyskytujících se v populaci. V roce 2008 byla surveillance pertuse a parapertuse zakotvena ve vyhlášce Ministerstva zdravotnictví ČR č. 473/2008 Sb., kde je stanovena závazná definice případů, včetně klinických, laboratorních a epidemiologických kritérií pertuse.

Pertuse se stala v ČR díky vysoké proočkovanosti populace opomíjenou infekcí. Epidemiologický posun do vyšších

Obr. 3 Odběrová souprava určená k PCR vyšetření



věkových skupin odpovídá klesající hladině protilátek v populaci. Tímto posunem onemocnění do vyšších věkových skupin probíhá infekce atypicky a tudíž není správně diagnostikována. I přes vzestupný počet případů onemocnění je celosvětově patrná značná podhlášenost případů. Proto je nezbytně nutné na pertusi více pomýšlet a provádět správné odběry materiálu k jejímu zachytu.

Laboratoře Centra klinických laboratoří Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě poskytují komplexní diagnostiku pertuse a parapertuse. Úzce spolupracují mezi sebou i s Národní referenční laboratoří pro pertusi při Státním zdravotním ústavu v Praze. Na níže uvedených kontaktech Vám rádi poskytneme informace o způsobu odběru klinického materiálu i samotné diagnostice.

Kontakty na mikrobiologické a imunologické laboratoře CKL ZÚ se sídlem v Ostravě provádějící vyšetření na pertusi a parapertusi

Kultivační vyšetření		
Laboratoř bakteriologie Ostrava	Mgr. Eva Krejčí, PhD.	596 200 228
	Mgr. Iveta Popelková	596 200 425
	Laboratoř resp. infekcí	596 200 328
	Odběrové soupravy	596 200 461
Laboratoř bakteriologie Havířov	RNDr. Jana Fránková	596 491 680
	Odběrové soupravy	596 491 682
PCR vyšetření		
Oddělení molekulární biologie	Mgr. Jakub Mrázek	596 200 266, 774 979 456
	Laboratoř	596 200 241
	Odběrové soupravy	596 200 461
Serologie		
Oddělení imunologie a alergologie	RNDr. Alena Kloudová	596 200 225
	Mgr. Jana Motlochová	596 200 240

Literatura:

Fabiánova K, Beneš Č, Šebestová H, Kynčl J, Částková J, Zavadilová J, Lžičarová D, Kříž B. Pertuse v ČR v roce 2012 - rozbor epidemiologické situace. Zprávy CEM (SZÚ Praha), 2013; 22(2)

Fabiánová K, Zavadilová J, Beneš Č, Kříž B. Pertuse v České republice v roce 2010. Zprávy CEM (SZÚ Praha), 2011; 20(1)

Rozšíření metod pro testování biocidní účinnosti dezinfekčních přípravků

Erich Pazdziora, Vít Ulmann, Ludmila Porubová

Testování účinnosti biocidů na ZÚ se sídlem v Ostravě

Výskyt kmenů bakterií rezistentních k řadě antibiotik, mykobakterií nereagujících na základní antituberkulotika, odolných spor a clostridiových infekcí, vysoce kontagiózních rotavirů a norovirů u dětí – to jsou příklady, kdy zodpovědné používání účinných dezinfekčních přípravků vede k předcházení vzniku a šíření nozokomiálních a profesionálních nákaz.

Široké spektrum rizikových původců nákaz se odráží v odpovídající nabídce Centra klinických laboratoří Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě (ZÚ), kterou v současné době doplnilo zavedením akreditovaných postupů pro stanovení baktericidní, sporicidní, mykobaktericidní a virucidní aktivity chemických dezinfekčních přípravků.

Postupy prováděné podle ČSN EN jsou nutné pro dobrou orientaci v nabídce dezinfekčních a antiseptických přípravků výrobců a dodavatelů, jak to požaduje Směrnice EU 98/8/ES z roku 1998 a Zákon 120/2002 Sb. v platném znění od roku 2013 o podmínkách uvádění biocidních přípravků a účinných látek na trh.

Spektrum prováděných testů ve Zdravotním ústavu nyní pokrývá všechny požadavky na posouzení účinnosti produktů

určených k dezinfekci rukou, k dezinfekci a vyššímu stupni dezinfekce zdravotnických prostředků a k dezinfekci ploch ve zdravotnických zařízeních a v ústavech sociální péče.

Testování **baktericidní a sporicidní** účinnosti provádí antibiologické středisko v laboratoři nozokomiálních nákaz a dezinfekce (ČSN EN 1040, 13727, 14561, 14347 a 13704).

Testování **mykobaktericidního** (včetně tuberkulocidního) účinku dle ČSN EN: 14348, 14563, bylo zahájeno v rámci provozu laboratoře pro diagnostiku mykobakterií. V současné době je vyšetření nabízeno jako součást komplexu testů. Zkoušení suspenzní metodou je vhodné pro tekuté nebo rozpustné dezinfekční prostředky. V další fázi může být rozšířeno o zkoušku na skleněném nosiči, která simuluje praktické podmínky použití.

Stanovení **virucidního** účinku podle ČSN EN 14476+1A je zajišťováno specializovanou laboratoří na tkáňových kulturách. Virucidní účinek pro tekuté a rozpustné dezinfekční prostředky je hodnocen na polio- a adenovirech. Pro širší spektrum typu virů je možno zkoušky doplnit o virus bovinní virové diarrhey (BVDV) a vakcinie.

Laboratoře dále nabízejí možnost předběžného stanovení účinnosti. Orientační vyšetření může sloužit pro rozhodnutí o dalším komplexním testování, zejména u nových produktů. Tímto způsobem lze zjistit, zda produkt vykazuje biocidní účinky s dostatečnou bezpečnostní rezervou v prostředí zatíženém bílkovinami a dalšími organickými látkami.

Výsledky testů jsou poskytovány ve formě protokolu o zkoušce a popřípadě doplněny o interpretaci zjištěných údajů.

Výsledky testů je možno konzultovat osobně s pracovníky zodpovědnými za jednotlivá vyšetření.

Novinky v praktickém využití měření hladin protilátek, imunoglobulinů třídy IgA, IgG a IgM proti *Aspergillus fumigatus*

Radim Dobiáš, Stanislava Dobiášová

Imunoglobuliny třídy A (IgA) mohou mít velký význam v diagnostice invazivních infekcí způsobených druhem *Aspergillus fumigatus*. Vedle dosud měřených tříd protilátek IgG a IgM se tak zařadila nově právě i třída IgA.

Při praktickém využívání měření hladin protilátek třídy A, G a M proti *Aspergillus fumigatus* metodou ELISA se u pacientů, kteří trpí různými formami primárních onemocnění (chronická obstruktivní plicní nemoc, intersticiální plicní nemoc, cystická fibróza, alergická bronchopulmonární alveolitida apod.) ukázalo, že sledování dynamiky hladin těchto protilátek může hrát významnou roli při potvrzení invazivní plicní aspergilózy (IPA), a to zejména při sledování dynamiky hladin IgA a IgG.

U pacientů s klinickým podezřením na IPA je standardně měřen signifikantní nárůst těchto hladin specifických protilátek proti *Aspergillus fumigatus*. Současně lze v některých případech prokázat galaktomanan, antigen rodu *Aspergillus*. V některých případech ovšem ne, což je do jisté míry dáno právě imunokompetencí těchto pacientů. U některých pacientů je také souběžně prováděn průkaz protilátek proti *Candida albicans* a vysoké hladiny IgG a IgA se, tak jako v případě měření protilátek proti *Aspergillus fumigatus*, nepotvrzují, což znamená vyloučení nespecificky zvýšených hladin protilátek jako je tomu v případě testu na IgA, IgG a IgM proti *Aspergillus fumigatus* (příklad stanovení protilátek u onkologického pacienta s potvrzenou IPA je uveden v grafu). Zvýšené hladiny imunoglobulinů třídy M (IgM) se vyskytují u většiny pacientů zřídka a dalo by se říci, že se jed-

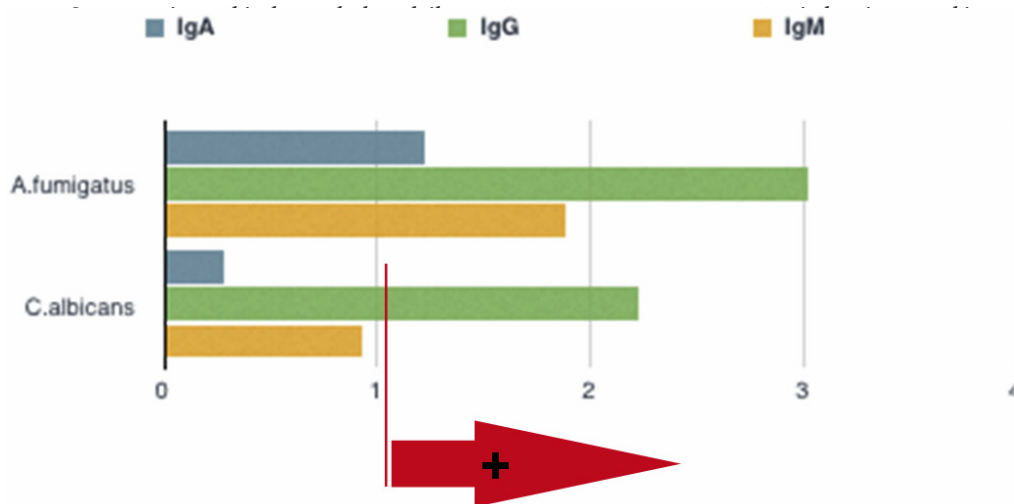
ná do jisté míry o nespecifickou reakci. Za výjimku mohou být považováni pacienti, kteří se v průběhu života nesetkali s konidiální náloží *Aspergillus fumigatus*, například díky svému nízkému věku.

V případě vyšších hladin IgM naměřených u pacienta s potvrzenou IPA v grafu by se mohlo jednat o nespecifickou odpověď. Avšak souběžně se ze stejného vzorku krve měřily hladiny IgA, IgG a IgM proti *Candida albicans* a zdaleka nedosahovaly takových hodnot jako v případě *Aspergillus fumigatus*, čímž bylo možné nespecifickou reakci vyloučit.

Další skupinu představují pacienti, u kterých je jejich primární onemocnění stabilizováno onkologickou léčbou. I u těchto pacientů imunitní systém reaguje na antigeny infekčního agens *Aspergillus fumigatus* a antigeny bývají často z krve vyvazovány protilátkami nebo se nedostatečně do krve prezentují. Proto je vyšetření na průkaz galaktomananu negativní. Protilátková odpověď proti *Aspergillus fumigatus* naměřena bývá, a to i ve třídě IgM. Hladiny protilátek jsou vyšší a reagují mnohdy ve všech třídách IgA, IgG a IgM.

V případě měření hladin protilátek ve třídě IgG lze diagnostiku prohloubit o zjištění avidity těchto protilátek a dosáhnout tak daleko přesnějšího výsledku. Zjistíme tak charakter těchto imunoglobulinů a zda-li se jedná o protilátkovou odpověď staršího typu nebo o protilátkovou odpověď novou. Tuto problematiku je nutné ještě více prozkoumat a dosáhnout standardizovaných interpretací.

Literatura u autora



Aktuální informace k rutinní identifikaci bakterií metodou MALDI-TOF MS

Eva Krejčí

Co je to identifikování bakterií? Identifikace bakterií znamená zařazení neznámého bakteriálního kmene na základě jeho vlastností do známého, již popsaného bakteriálního druhu. Dlouhá léta převládala mezi identifikačními metodami v rámci rutinní praxe tzv. biochemická identifikace – zařazení do příslušného bakteriálního druhu na základě využívání (či nevyužívání) jednotlivých specifických substrátů. Čistá kultura bakteriálního kmene (nebo obecně mikroorganismu) tak mohla být identifikována běžně za 18–24 hodin. Je třeba si také uvědomit, že pro rutinní identifikace bakterií jsou využívány komerčně dostupné mikrotesty, jejichž identifikační schopnosti mohou být omezené – zahrnují v daném okamžiku vždy jen konečné množství bakteriálních druhů.

Metodu identifikace kmene mikroorganismu na základě výsledku analýzy hmotnostních spekter získaných metodou MALDI-TOF jsme si v Centru klinických laboratoří mohli vyzkoušet již před 3 lety. Dnes je metoda rutinně používána jako akreditovaná. Jedná se o analýzu spekter molekulových hmotností, které jsou identifikovány na základě exprese jejich vlastních bílkovin. Tento spektrální obraz proteinové exprese se porovnává s referenčními hodnotami uvedenými v databázi systému.

Rozdíly v získaných hmotnostních spektrech jsou natolik významné a metoda natolik přesná, že ji lze použít k odlišení bakteriálních druhů – hmotnostní spektra jsou specifická a unikátní pro daný bakteriální druh. Oproti stanovení čas-

tečné sekvence 16S rDNA je metoda analýzy hmotnostních spekter daleko rychlejší – jeden kmen je možno analyzovat do několika minut.

Díky univerzálnosti analýzy hmotnostních spekter je relativně velmi snadné doplnit nová data u nově popsaných bakteriálních druhů. Výhodou metody je velmi snadná příprava vzorku a rychlost identifikace s vysokou přesností.

Stále však existují kmeny bakterií, u kterých je třeba rozhodnout o konečné identifikaci až na základě biochemických vlastností, tedy za 18–24 hod. Využívání velmi přesné metody identifikace analýzou hmotnostních spekter je tak velice přínosné vždy a pouze jedině tehdy, pokud je využívána v kombinaci s vysokou kvalitou kultivačních a jiných identifikačních technik v rámci celé laboratoře.

Databáze pro srovnání hmotnostních spekter zahrnuje přes 2000 bakteriálních druhů. Nově se tedy v rámci výsledků lze setkat s novými názvy bakterií, které souvisejí s možností bakterie přesně identifikovat. Nové názvy bakterií jsou však vždy ve výsledku uváděny s komentářem či uvedením zpřesňující poznámky. Posouzení významnosti nálezu je vždy na lékaři. Pouze přesná identifikace může přinést přesný obraz o mikroorganismech nacházejících se u infekčních procesů na daném místě těla pacienta – sledování kdy a za jakých okolností se ta která bakterie vyskytuje a srovnání s klinickým stavem tak může naše vědění o infekčních procesech opět malinko posunout.

Calprotectin, marker pro diagnostiku nespecifických střevních zánětů (IBD)

Jana Motlochová

Nespecifické střevní záněty (inflammatory bowel diseases, IBD) jsou chronická onemocnění trávicího traktu postihující především tenké a tlusté střevo. Řadíme mezi ně Cronovou nemoc (CN) a ulcerózní kolitidu (UC). Tato dvě onemocnění jsou si v mnohém příbuzná, ale lokalizací postižení, charakterem zánětlivých změn i prognózou jsou zásadně rozdílná. U CN zánět postihuje všechny vrstvy střevní stěny a může být lokalizován v jakékoliv části trávicího traktu, nejčastěji však v terminálním ileu. Postižené segmenty trávicí trubice mohou být střídány úseky intaktními. UC postihuje střevní sliznici a submukózu a zánět je lokalizován kontinuálně od konečníku pouze v tlustém střevě. Tato onemocnění mají kolísavý průběh, kdy období aktivního onemocnění střídá období remise. Jejich etiologie není zcela známá, příčinou je pravděpodobně genetická predispozice, důležitou roli hrají faktory zevního prostředí, životní styl, stravovací návyky a podobně. Ve vyspělých zemích Evropy a v USA se roční incidence CN pohybuje od 4–6 a u UC od 6–12 případů na 100 000 obyvatel. Prevalence v těchto zemích u obou chorob je 270–350 pacientů na 100 000 obyvatel.

Diagnostika IBD není jednoduchá. Jako „zlatý standard“ slouží kolonoskopie a histologické vyšetření bioptických

vzorků. Tato vyšetření jsou však invazivní, zatěžující pacienta. Mezi základní laboratorní vyšetření patří vyšetření krevního obrazu, sedimentace, stanovení CRP, hemoglobinu, železa a albuminu. Jsou to však vyšetření nespecifická a jejich význam v diagnostice a monitoringu onemocnění je rámcový. O něco větší přínos má sérologické stanovení protilátek proti cytoplasmě neutrofilů - ANCA (UC pozitivita ANCA v 80%) a proti *Saccharomyces cerevisiae* - ASCA (CN pozitivita ASCA v 80%). V posledních letech předmětem řady studií bylo nalezení vhodného markeru, který by s dostatečnou senzitivitou a specificitou odrážel zánětlivou aktivitu IBD a omezil tak počet nutných invazivních vyšetření. Výsledky těchto studií ukazují, že vhodným markerem může být stanovení koncentrace calprotectinu ve stolici.

Calprotectin je protein, který se řadí mezi proteiny akutní fáze. Je produkován neutrofily, v menší míře se nachází v monocytech a makrofázích. Calprotectin má antibakteriální a antimykotické vlastnosti, indukuje apoptózu a vystupuje jako chemotaxin. Při zánětlivé reakci aktivované neutrofilní granulocyty uvolňují calprotectin a jeho hladina se postupně zvyšuje jak v tělních tekutinách (v séru, likvoru, moči), tak i ve stolici (koncentrace calprotectinu ve stolici je

několikrát vyšší než jeho koncentrace v séru). Hladiny fekálního calprotectinu jsou u pacientů s aktivním IBD signifikantně vyšší než u zdravých osob nebo u pacientů s funkčními poruchami gastrointestinálního traktu (IBS) bez akutní zánětlivé složky.

Dalším poznatkem je, že koncentrace fekálního calprotectinu u UC koreluje s aktivitou onemocnění zjištěnou při kolonoskopickém vyšetření. Tato korelace nebyla jednoznačně potvrzena u CN. Zánětlivý proces ve střevě nastupuje zvolna bez klinické manifestace, až dosáhne kritické fáze. Pravidelným monitorováním hladiny fekálního calprotectinu lze zachytit ono „plíživé bezpříznakové“ narůstání zánětlivého procesu v trávicím traktu a reagovat na něj léčbou. Z uvedení vyplývá, že fekální calprotectin může být také ukazatelem možného relapsu onemocnění. Jeho prediktivní hodnota je větší u pacientů s UC a pacientů s kolickou formou CN než u CN s postižením ilea. Je třeba mít na paměti, že zvýšená koncentrace fekálního calprotectinu může být také u některých střevních nádorů, aktivních revmatických onemocnění, akutního zánětu slinivky břišní, cirhózy jater, při námaze, při léčbě protizánětlivými nesteroidními léky nebo např. při jakémkoliv krvácení do zažívacího traktu.

Literatura:

Kompraus M., Wos H., Wiecek S., Kajor M et al. Usefulness of Faecal Calprotectin Measurement in Children with Various Type of Inflammatory Bowel Disease, Hindawi Publishing Corporation, vol.2012, Article ID 608249, 5 pages doi: 10.1155/2012/608249

Kallel L., Ayadi I., Matri S., Feláh M. et al. Fecal calprotectin is a predictive marker of relapse in Crohn's disease involving the colon: a prospective study. Eur J Gastroenterol Hepatology, 2010, 22:340–345

Shaodong W., Zhenkai W., Hui S., Lu H. et al, Faecal calprotectin concentrations in gastrointestinal diseases, Journal of International Medical Research, 2013, 41(4) 1357–1361

Lukáš M., Idiopatická střevní záněty a biologická léčba, Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinické a výzkumné centrum pro idiopatické střevní záněty

Naše laboratoř pro diagnostiku nespecifických střevních zánětů nabízí vyšetření IBD screeningu a pro odhad a monitorování vyšetření calprotectinu ve stolici.

IBD screen je prováděn na kombinaci tří tkáňových substrátů a to na opičím pankreatu, opičím tenkém střevě, lidských granulocytech a na náplavu *Saccharomyces cerevisiae*. U CN prokazujeme autoprotilátky proti acinárním buňkám pankreatu, pohárkovým buňkám a *Saccharomyces cerevisiae*. U UC jsou obvykle přítomny protilátky proti pohárkovým buňkám tenkého střeva a ANCA.

Vyšetření fekálního calprotectinu provádíme rapid testem (imunochromatografický test), kdy výsledek je do druhého dne (alternativně metodou ELISA s odezvou do týdne). Jde o kvantitativní stanovení a hodnocení se uvádí v $\mu\text{g/g}$. Pro vyšetření je zapotřebí odebrat stolici minimálně velikosti lískového oříšku. Vzorek stolice může být transportován do laboratoře při pokojové teplotě, při které je stabilní 5–7 dní, aniž by došlo ke změně jeho vlastností.

V odborné gastroenterologické literatuře již dnes panuje shoda, že fekální calprotectin je výhodný neinvazivní marker pro diagnostiku a monitorování IBD, je užitečný pro predikci relapsu u pacientů s IBD a posouzení odpovědi na léčbu a také slouží k rozlišení zánětlivého střevního onemocnění od funkčních střevních onemocnění (IBS).

Rozpis služeb v době vánočních svátků

Laboratoř bakteriologie a antibiotické středisko Ostrava

Út 24.12.2013	6:00 – 14:30
St 25.12.2013	8:00 – 13:30 (jen urgentní materiál)
Čt 26.12.2013	6:00 – 14:30
St 1.1.2014	8:00 – 13:30 (jen urgentní materiál)

Oddělení imunologie a alergologie

Út 24.12.2013	8:00 – 13:30
Čt 26.12.2013	8:00 – 13:30

Laboratoř bakteriologie Havířov

Út 24.12.2013	6:00 – 13:30
St 25.12.2013	6:00 – 13:30
Čt 26.12.2013	7:00 – 11:00
St 1.1.2014	7:00 – 11:00

(příjem materiálu půl hodiny před koncem pracovní doby)

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, Ing. Pavel Jurčík, Mgr. Tereza Prokopová, MVDr. Romana Mašková

Náklad: 1 500 výtisků

www.zuova.cz

