ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020 **Veronika Majerová**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Jméno Příjmení

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA RESPIRAČNÍCH INFEKCÍ

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík Ph.D

PLZEŇ 2020

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Veronika MAJEROVÁ**
Osobní číslo:	**Z17B0092P**
Studijní program:	**B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Téma práce:	**Laboratorní diagnostika respiračních infekcí**
Zadávající katedra:	**Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- SCHINDLER, Jiří. Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů. 1. vyd. Praha: Garda, 2009. 223 s. ISBN 978-80-247-3170-4
- ROSYPAL, Stanislav (et al). Obecná bakteriologie. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981. 749 s. 000004526
- BEDNÁŘ, Marek (et al.). Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. 558 s. 000003823
- VOTAVA, Miroslav a kol. Lékařská mikrobiologie- vyšetřovací metody. Brno: Neptun, 2010. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7
- SETHI, Sanjay. Respiratory infections. 1. vyd. CRC Press. 2017, 360 s. ISBN 9781138114890

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.**
Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **18. června 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2020**

Západočeská univerzita v Plzni Fakulta zdravotnických studií

L.S.

PhDr. Lukáš Štich
děkan

Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

V Plzni dne 31. ledna 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 20. 3. 2020.

……

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Majerová Veronika

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Respirační infekce a jejich laboratorní diagnostika

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík Ph.D

Počet stran – číslované: 65

Počet stran – nečíslované: 15

Počet příloh: 2

Počet titulů použité literatury: 47

Klíčová slova: respirační infekce, bakteriologie, mykologie, virologie, laboratorní diagnostika

Souhrn:

Má bakalářská práce obsahuje popis vybraných respiračních infekcí a s nimi související patogenní původce, způsoby odběru vzorků a jejich následnou diagnostiku. Druhá část se týká popisu metodiky jednotlivých pracovních postupů a analýzy získaných dat s jejich vzájemným porovnáním. Nejhojněji vyskytujícími se původci respiračních infekcí jsou viry a proto se má analýza dat týká právě virologické diagnostiky. Viry se liší jak způsobem jejich izolace, tak i následnou detekcí. Používanými metodami v klinické praxi jsou například sérologická metoda ELISA, KFR nebo HIT, nebo genetická metoda RT-PCR.

Abstract

Surname and name: Majerová Veronika

Department: Department of Theoretical Branches

Title of thesis: Respiratory infections and their laboratory diagnosis

Consultant: RNDr. Karel Fajfrlík Ph.D

Number of pages – numbered: 65

Number of pages – unnumbered: 15

Number of appendices: 2

Number of literature items used: 47

Keywords: respiratory infections, bacteriology, virology, mycology, laboratory diagnosis

Summary:

My bachelor‘s work includes description of chosen respiratory infections and their pathogenic causers, methods of samplig and resulting laboratory diagnosis. In the second part of my work is methodology of work proceeding and acquired data analysis with their mutual comparison. The most occurring causers respiratory infections are viruses a because of that is my analysis about virus diagnostics. Viruses vary their method of izolation and also method of diagnostics. Used methods in clinical practice are for example serological methods ELISA, KFR and HIT, or genetically methods RT-PCR.

Předmluva

Hlavním důvodem sepsání páce bylo definování a kategorizace infekcí respiračního traktu spolu s typickými zástupci patogenních agens. Další částí bylo tabelární a grafické zpracování výsledků, které potrzují stanovené cíle a hypotézu v kapitole šest.

Poděkování

Děkuji RNDr. Karlu Fajfrlíkovi za odborné vedení práce, poskytování rad, materiálních podkladů a pomoc při psaní práce a zpracování výsledků. Dále děkuji pracovníkům Fakultní nemocnice v Plzni a celému mikrobiologickému oddělení za poskytování odborných rad, material a výsledků testů ke zpracování.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ 12
SEZNAM OBRÁZKŮ 13
SEZNAM TABULEK 14
SEZNAM ZKRATEK 15
ÚVOD 17
TEORETICKÁ ČÁST 18
1 ANATOMICKÝ POPIS A ZÁKLADNÍ ROZDĚLENÍ DÝCHACÍHO TRAKTU 18
1.1 Horní cesty dýchací 18
1.2 Dolní cesty dýchací 19
2 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA RESPIRAČNÍCH INFEKCÍ 20
2.1 Odběr biologického materiálu 20
2.1.1 Výtěry z nosu a hrdla 20
2.1.2 Odběr hemokultury 20
2.1.3 Odběr sputa 21
2.1.4 Bronchoalveolární laváž 21
2.1.5 Odběr venózní krve 21
2.2 Laboratorní vyšetření při podezření na infekci respiračního traktu 22
2.2.1 Pomocné vyšetření krevního obrazu a CrP 22
2.2.2 Mikrobiologické vyšetření zaměřené na přímý průkaz původce onemocnění 23
2.2.3 Vyšetření zaměřené na nepřímý průkaz původce onemocnění 27
3 VYBRANÍ BAKTERIÁLNÍ PŮVODCI RESPIRAČNÍCH INFEKCÍ 29
3.1 Rod Haemophillus 29
3.1.1 Haemophillus influenzae 29
3.2 Rod Streptococcus 29
3.2.1 Streptococcus pneumoniae 30
3.2.2 Streptococcus pyogenes 30
3.3 Rod Staphylococcus 31
3.3.1 Staphylococcus aureus 31
3.4 Rod Mycobacterium 32
3.4.1 Mycobacterium tuberculosis 33
3.5 Rod mycoplasma 34
3.5.1 Mycoplasma pneumoniae 34
3.6 Rod Corynebacterium 35
3.6.1 Corynebackterium diphteriae 35
3.7 Rod Legionella 35

3.7.1 Legionella pneumophila 35
3.8 Rod Bordetella 36
3.8.1 Bordetella pertusis, Bordetella parapertussis 36
3.9 Rod Chlamydia 37
3.9.1 Chlamydophila pneumoniae, Chlamydophila psittaci, Chlamydia trachomatis 37
4 VYBRANÍ VIROVÍ PŮVODCI RESPIRAČNÍCH INFEKCÍ 38
4.1 Rhinoviry 39
4.2 Koronaviry 39
4.3 Pneumovirus 40
4.4 Čeleď Orthomyxoviridae 40
4.5 Čeleď Paramyxoviridae 41
4.6 Herpes viry 41
5 VYBRANÍ MYKOTIČTÍ PŮVODCI RESPIRAČNÍCH INFEKCÍ 42
5.1 Rod Candida 43
5.1.1 Candida albicans 43
5.2 Rod Aspergillus 43
5.2.1 Skupina Aspergillus fumigatis, Aspergillus flavus, Aspergillus niger 44
PRAKTICKÁ ČÁST 45
6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE 45
6.1 Hlavní cíl 45
6.2 Dílčí cíle 45
7 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY 45
8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU 45
9 METODIKA PRÁCE 46
9.1 Oběr materiálu 46
9.2 Shrnutí prováděných testů na průkaz virových agens zahrnutých do respiračního panelu laboratoře ve FN Plzeň 48
9.3 Detekce protilátek metodou ELISA proti virovým a bakteriálním agens obsažených v respiračním panelu 49
9.4 Průkaz virů respiračního panelu diagnostikované pomocí izolačních metod 50
9.5 Průkaz virů respiračního panelu pomocí metody PCR 52
9.6 Detekce protilátek metodou KFR proti virovým agens a bakterii Mycoplasma pneumoniae 54
9.7 Diagnostika virů respiračního panelu hemaglutinačně inhibičním testem 56
10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ 58
DISKUZE 67
ZÁVĚR 70

BIBLIOGRAFIE 71
SEZNAM PŘÍLOH 76

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Porovnání počtu vyšetřených pacientů a pozitivních pacientů za odbobí říjen 2018-září 2019……...59
Graf 2 Celkové srovnání diagnostikovaných pacientů ve vyšetřovaném období ……..59

Graf 3 Porovnání počtu vyšetřených a pozitivních pacientů pomocí metody PCR za vyšetřované období……..60
Graf 4 Porovnání počtu vyšetřených a pozitivních pacientů pomocí sérologických metod za vsšetřované období……..61
Graf 5 Porovnání vyšetřených a pozitivních pacientů pomocí metody izolace za vyšetřované období ……62
Graf 6 Detkce respiračních virů pomocí PCR metody za vyšetřované období……..63
Graf 7 Detekce jednotlivých druhů virů pomocí metody PCR za všetřované období……...64
Graf 8 Zhodnocení využití jednotlivých druhů metod za vyštřované období ……65

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 LMP ukázka buněčné kultury …….52
Obrázek 2: Negativní výsledek PCR ……..54
Obrázek 3: Pozitivní výsledek PCR ……...54
Obrázek 4: Serokonverze Mycoplasma pneumonie KFR ……..77
Obrázek 5:Respirační syncitiální virus , Imunofluorescenční detekce……77
Obrázek 6: MDCK, Chřipka typu A1……..77
Obrázek 7: VERO, HSV typu II …….78
Obrázek 8: Parainfluenzavirus typu III, Imunofluorescenční detekce ……78
Obrázek 9: LEP, Adenovirus …..……78
Obrázek 10: MDCK, Chřipka typu B …….……79
Obrázek 11: VERO, Respirační syncitiální virus ……..79
Obázek 12: LEP, HSV typu I ……..79

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Typy odběrových materiálů pro bakteriologické a mykobakteriologické oddělení……...47

Tabulka 2 Typy odběrových materiálů pro virologické oddělení……48

Tabulka 3 Souhrnné zhodnocení prováděných testů respiračního panelu Oddělní virologie FN Plzeň……...48

Tabulka 4 Ředění komplementu……..55

Tabulka 5 Hodnocení KFR dle používané symboliky……56

Tabulka 6 Porovnání počtu vyšetřených a pozitivních pacientů za vyšetřované období říjen 2018- září 2019…….58

Tabulka 7 Porovnání způsobů analýzy a počtu pacientů za vyšetřované období……...60

Tabulka 8 Detekce virů pomoci metody PCR…….63

Tabulka 9 Zhodnocení využití jednotlivých metod za vyštřované období……..64

Tabulka 10 Tabulka č. 10 Znázornění celkového počtu vyšetřených pacientů metodou PCR, sérologickými metodami a kultivací spolu s počtem pozitivních pacientů na konkrétní virus za vyšetřované období ve FN Plzeň……..66

SEZNAM ZKRATEK

BAL	Bronchoalveolární laváž
CrP	C- reaktivní protein
a.	Latinsky *arteria* - tepna
LDL	Low-density-lipoprotein , lipoproteiny o nízké hustotě
DNA	*Deoxiribonucleotid acid* deoxyribonuleová kyselina
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RT- PCR	
Ag	Antigen
Ab	Protilátka , *antibody*
S.	Streptococcus
KFR	Komplement fixační reakce
HIT	Hemaglutinační inhibiční test
ELISA	*Enzyme-linked immune-sorbent assay*
MTB	*Mycobacterium tuberculosis*
RNA	*Ribonucleotid acid ,* Ribonukleová kyselina
SARS	Severe acute respiratory syndrome, těžký akutní respirační syndrome
RSV	Human respiratory syncytial virus, respirační syncyciální virus
HEF	Hemaglutinin-Esterase-Fusion
MPA	Masopeptonový agar
FN	Fakultní nemocnice
LMP	Lidské embryonální plíce, kultivační půda virů
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney, kultivační půda virů
TMB	3,3‘,5,5‘-Tetramethylbenzidin
IgA	Imunoglobulin typu A

CLED půda	*Cystine-lactose-electrolyte deficient agar*
HSV	*Herpes simplex virus*
HHV 6	Lisdský herpesvirus typu 6
ATP	Adenosintrifosfát
PBS	Fosfátový pufr, *phosphate Buffered Saline*
K_3EDTA	*Tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid*
NRL	Národní referenční laboratoř
RDE	*Receptor destroying enzyme*
CF	Cystická fibróza
RRI	*Recurent respiratory infections*

ÚVOD

Ve své práci se budu snažit čtenářům přiblížit jeden z nejčastějších druhů infekcí a jednotlivé laboratorní postupy, které s těmito onemocněními souvisejí. Na respirační infekce můžeme pohlížet z různých hledisek. Jedno hledisko je epidemiologické - dle způsobu nákazy. V takovém případě je jejich výčet poměrně dlouhý, protože by nutně musel obsahovat všechna onemocnění, jejichž vstupní branou je respirační trakt. Jím vstupují do našeho organismu milióny mikroorganismů, ale jen malá část je schopna vyvolat onemocnění. Cílem práce je spíše praktické hledisko – představit agens (a jejich laboratorní diagnostiku), která působí v respiračním traktu onemocnění a od toho se odvíjí způsob odběru materiálu a jeho zpracování ve všech podoborech mikrobiologie. Vzhledem k velké rozmanitosti bakteriálních původců těchto onemocnění a stejně rozmanitým možnostem laboratorní diagnostiky se v praktické části budu podrobně věnovat pouze laboratorní diagnostice virových respiračních onemocnění.

V prvé části se budu snažit stručně popsat základní úseky dýchacího traktu jejich dělení a nejčastější agens, která mohou v jednotlivých úsecích negativně působit. Je to široká škála patogenů - bakterie, viry a některé druhy hub. Ačkoliv se u pacientů objevují obdobné příznaky postižení dýchacích cest (horečka, dávivý kašel, ztížené dýchaní, pneumonie atd.) jejich původci jsou různí. Laboratorní diagnostika využívá mnoho testů, které buď přímo prokazují patogeny, nebo dokazují jejich přítomnost v organism v minulosti. Přímé diagnostické testy vycházejí z přímé identifikace patogena. Sem patří metody mikroskopické, kultivační, průkaz antigenu patogena nebo detekce jeho genetické informace. Ne všichni patologičtí původci infekcí dýchacích cest jsou ale snadno detekovatelní, proto se v mnoha případech využívá možnost nepřímého stanovení. Lidský organismus na cizorodé antigeny, které nejsou tělu vlastní, reaguje imunologickou reakcí. Je spuštěňa syntéza protilátek, pomocí kterých pak můžeme onemocnění identifikovat nepřímo na základě jejich detekce. V některých případech umíme určit i fázi onemocnění z jednoho vzorku, jindy je nutné vyšetřit párová séra a sledovat dynamiku tvorby protilátek.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ANATOMICKÝ POPIS A ZÁKLADNÍ ROZDĚLENÍ DÝCHACÍHO TRAKTU

Dýchací soustava je jednou z našich tělních orgánových soustav. Mezi její hlavní funkce patří výměna dýchacích plynů, tedy okysličování tkání a odvod oxidu uhličitého. Proces dýchání je umožněn na principu difuze plynů díky rozdílným parciálním tlakům jednolivých plynů. (Kott, 2009) Prostřednictvím dýchání dochází k vyrovnávání acidobazické rovnováhy. Mezi další funkce dýchací soustavy patří například fonace párovými hlasivkovými chrupavkami hrtanu. Další z vedlejších funkcí je podílení se na tvorbě a produkci *angiotensinu II,* jedná se o složku rennin-angiotenzinového systému, který napomáhá v regulaci krevního tlaku. (Ionescu, 2013) Nejčastěji dělíme dýchací trakt na horní cesty dýchací a dolní cesty dýchací. (Kott, 2009)

1.1 Horní cesty dýchací

Horní cesty dýchací se skládají z dutiny nosní (*cavitas nasi)* a vedlejších dutin a nosohltanu (*nasopharynx).* (Kott, 2009) Jejich hlavní funkcí je přívod vzduchu k buňkám v plicích, kterým je umožněno vyměňovat dýchací plyny.

Vdechnutí vzduchu začíná v dutině nosní, kde je vzduch částěčně očištěň a zvlhčen a dále posouván do nosohltanu a následně do hrtanu. (Clemente, 2010)

Dutina nosní (*cavitas nasi*) je tedy místo kterým se vzduch dostává do lidského těla. V jednotlivých částech dochází k jeho úpravě a vhánění do dalších částí dýchacího traktu. V prvé řadě dochází k jeho ohřátí díky bohatému žilnímu zásobení. Jednotlivé částěčky, které jsou od vzduchu filtrovány ulpívají na hlenu, který zároveň svým vypařováním umožňuje i zvlhčování vzduchu. V hlenu jsou dále také přítomny některé imunoglobuliny, které fungují jako jedna z prvních bariér proti infekcím. (Kott, 2009)

Vedlejší dutiny nosní (*sinus paranasales*) jde o pomocný systém dýchacích cest, který je tvořen čtyřmi lebečními dutinami. Jde o dutinu kosti čelní, dutinu kosti čichové, dutinu kosti klínové a dutinu horní čelisti. Paranasální sinusy snižují celkovou váhu lebky, umožňují fonaci zvuku tvořeného v hrtanu a svými sekrety zvlhčují dutinu nosní, respektive její sliznici. (Kott, 2009)

Nosohltan (nasopharynx) je horní část hlatnu. Vede vdechnutý, zvlhčený a ohřátý vzduch dále do hlubších částí respiračního systému. (Clemente, 2010)

Nemoci horních cest dýchacích mohou poškozovat jakýkoliv úsek, ze kterého se horní cesty dýchací skládají. Může se jednat o skupinu onemocnění RRI (reccuent respiratory infections), opakující se dýchací infekce jako je například astma, bronchitidy nebo imunitní nedostatečnost. Další kategorí jsou onemocnění jako je například CF (cystická fibróza) nebo imunodeficientní syndromy. Méně závažnými, ale na druhou stranu velmi častými onemocněními jsou sinusitidy, rhinitidy, nasopharingitidy a s nimi související otitidy.

Původci nákazy mohou být nejrůznější patogeny jako jsou například bakterie, viry, plísně a houby, ale i například pylové alergeny. (Prabahar, 2017)

1.2 Dolní cesty dýchací

Dolní cesty dýchací jsou tvořeny hrtanem, průdušnicí, průduškami, průdušinkami a plícemi.

Hrtan *(larynx*) je tvořen párovými a nepárovými chrupavkami . Párové hlasivkové chrupavky mají za hlavní funkci fonaci, tvorbu zvuku hlasu, který je dále upravován ve vedlejších dutinách. Nepárovými chrupavkami jsou štítná chrupavka, prstencová chrupavka a příklopka hrtanová (*epiglottis*) (Harrison, 1995) Mezi hrtanem muže a ženy jsou drobné anatomické rozdíly, které se prohlubují během období pohlavního dospívaní. (Kott, 2009)

Průdušnice (*trachea*) je vysoce flexibilní, dvacet centimetrů dlouhá trubice, která se v dolních částech dělí na dvě hlavní průdušky (pravou a levou). Je navázána na prstenčitou chrupavku hrtanu. Trachea je vystlána víceřadým cylidrickým epitelem s řasinkami, který umožňuje posouvání hlenu tvořeného v pohárkových buňkách. (Krstic, 1991)

Pravá a levá hlavní průduška (*primary bronchi)* jsou posledním úsekem dýchacího systému, jehož funkcí je vzduch posouvat, popřípadě lehce upravovat před jeho vstřebáváním. Pravá a levá hlavní průduška vstupují do plic kde se větví v bronchialní strom. (Rex Bookstore, 2007). Poslední částí bronchiálního stromu je terminální bronchus, ten pozvolna přechází v plicní sklípek, místo vlastního dýchání. (Vanpeperstraete, 2012)

Plíce *(pulmonis)* párový asymetrický orgán chráněný hrudním košem, jsou uloženy v pravé a levé pohrudniční dutině. (Kott, 2009) Plíce jsou rozděleny na jednotlivé laloky. Pravá plíce má tři a levá jen dva. Na povrchu jsou plíce kryty pleurou. Do plic vstupují

průdušky, které se dělí z průdušnice. Spolu s nimi do plic vstupují větve plicní tepny (*a. pulmonis)* a cévy lymfatického systému. (Thurlbeck, 1995)

2 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA RESPIRAČNÍCH INFEKCÍ

2.1 Odběr biologického materiálu

2.1.1 **Výtěry z nosu a hrdla**

Výtěry z nosu a hrdla jsou nejčastějšími odběry, které se provádějí u pacientů s podezřením na respirační onemocnění. Výtěry se provádějí pomocí komerčních odběrových sterilních sad dodávaných výrobcem. Odběr se provádí předem daným postupem, aby došlo ke správnému odběru bez kontaminace cizími částicemi z okolí nebo jiných úseků hrdla a dutiny nosní pacienta, které by mohly ovlivnit výsledek. Sada pro odběr se skládá ze sterilní vatové tyčinky uložené v odběrové zkumavce s transportním médiem. Při odběru dochází k otření nebo vytření hnisavého ložiska pacienta vatovou tyčinkou. Je důležité aby při odběru nedošlo k setření jiného místa v hrdle či nosu. Při následné kultivaci by pak došlo k vypěstování jiných kolonií patogenů. (Altman, 2009)

2.1.2 **Odběr hemokultury**

Hemokultivace, neboli odběr hemokultur je nezbytné vyšetření při podezření na infekci krevního řečiště. Ty mohou být buď primární, zdroj je přítomen v krevním řečišti (například krevní infekce, endokarditidy), nebo sekundární, kdy je zdroj mimo krevní řečiště (například urosepse). Odběr se provádí venepunkcí, které předchází odstranění mastnosti a dezinfekce z místa vpichu 70% alkoholem a dezinfekčním prostředkem. Desinfikují se i gumová víčka na transporních a kultivačních lahvičkách. Standartní odběr je 10-20 ml krve. Tento objem je dále rozdělen do jednotlivých lahviček sloužících k aerobní a anaerobní kultivaci. Doporučený počet odběrů jsou 2-3 odběry v 15-30 minutových intervalech. Indikací k odběru může být například vysoký vzestup teploty, přítomnost zimnice, podezření na katétrovou infekci a mnoho dalších. Na lahvičku je nutné přesně zapsat údaje o pacientovi a místu odběru, nebo lokace katétru. U dětských pacientů jsou použity lahvičky o menším obejmu, je tak možné odebrat menší objem krve a dosáhnout stejné efektivity testu. V laboratoři se lednotlivé lavičky vkládají do termostatů kde dochází ke sledování nárůstu kolonií patogenů. (Košťálová, 2017)

2.1.3 **Odběr sputa**

Sputum je ochranný hlen přítomný ve spodních dýchacích cestách. Jeho funkcí je chránit dýchací trakt před infekcemi a částicemi, které obsahuje vdechnutý vzduch. Je tvořen sekrety dutin a přirozenou bakteriální florou. Odběr sputa se obvykle provádí spolu s dalšími diagnostickými metodami jako je například výtěry z nosu a hrdla, bronchoskopie nebo BAL.

K odběru jsou používány komerčně dodávané kontejnery s obsahem transportního media a samotný odběr se provádí asepticky v jednorázových gumových rukavicích. Při odběru pacient obvykle sedí na židli, ústa má vypláchnutá vodou aby se vzorek nekontaminoval slinami. Dále je pacient vyzván k hlubokému kašli a vykašlaný obsah se dává do připraveného kontejneru. Ten je pak zevně očištěn a jsou na něj napsány potřebné údaje o pacientovi a požadovaném vyšetření. (Wilkins, 2009)

2.1.4 **Bronchoalveolární laváž**

Bronchoalveolární výplach (BAL) je jeden z méně příjemných způsobů získávání vzorku pacienta. Nepohodlí pacienta vyvažuje jeho možnost poskytnutí relativně komplexních informací o malignitách nebo patogenech způsobujících infekce.

Tento odběr se provádí vpuštěním menšího objemu (120-150 ml) solné tekutiny bronchiálního stromu plic úzkou trubičkou zavedenou ústy pacineta, která je následně opět odčerpána zpět do sterilní nádobky a odeslána na laboratorní vyšetření. U pacientů v různých stavech úzkosti nebo strachu z vyšetření je možné podat sedativa. S odebraným vzorkem se v laboratoří provádí cytologická vyšetření rutinním barvením hematoxylinem a eosinem, diferenciální rozpočet jednotlivých elementů přítomných v roztoku a mikrobiologická vyšetření. (Cytol, 2014)

2.1.5 **Odběr venózní krve**

Odběry krve pro mikrobiologická vyšetření se provádějí do jednorázových, vakuově uzavřených zkumavek. Zkumavky mohou obsahovat pouze krev pacienta, nebo se mísit s protisrážlivým médiem. Druh zkumavky je vybírán podle následného vyšetření a po provedeném odběru je označen údaji o pacientovi v souladu s požadavky laboratoře. (Laboratorní příručka Ústavu mikrobiologie)

2.2 Laboratorní vyšetření při podezření na infekci respiračního traktu

2.2.1 Pomocné vyšetření krevního obrazu a CrP

Vyšetření krevního obrazu

Toto vyšetření je jedním ze základních vyšetření pacienta. Materiálem pro provedení je žilní krev pacienta ve zkumavce obsahující protisrážlivý roztok K_3EDTA. Test se provádí v analyzátorech krevního obrazu a v případě výskytu abnormalit nebo nesrovnalostí je zopakován ručně nátěrem kapky krve na sklíčko. Sledujeme počet, obejm a tvar erytrocytů množství hemoglobinu, leukocytů a trombocytů. Některé hodnoty jsou vypočteny přímo přístrojem (počet hodnocených elementů), jiné se odvozují z již zjištěných hodnot jako je například hodnota MCH (průměrné množství Hb v buňce) a MCHC (průměrné množství Hb v jednom erytrocytu) Podle parametrů krevního obrazu jsou lékaři schopni sdělit diagnózu nebo sledovat průběh terapie. (Conde, 2018)

Na odebrané krvi se odráží životospráva pacienta, proto je důležité, aby pacienti před vlastním odběrem krve dodržovali jisté preanalytické postupy. Například nadměrná fyzická zátěž nebo konzumace alkoholu či nedostatečné lačnění může zásadně ovlivnit výsledky nebo úplně znemožnit měření. (Špinar, 2013)

Vyšetření CrP (C-reaktivní proteinu)

CrP nebo-li C-reaktivní protein je jedním z proteinů akutní fáze , je nespecifický a produkován játry. Vyšetření množství tohoto proteinu se využívá k diagnostice bakteriálních onemocnění a zánětlivých onemocnění jako mohou být například revmatická horečka nebo revmatoidní artitida.

Normální hodnoty se pohybují okolo < 1,0 mg / dL krve. Lehce zvýšené hodnoty nabývají hodnot 1,0 -3,0 mg / dL krve vysoké hodnoty CrP poukazující na příomnost zánětu v těle dosahují hodnot > 3,0 mg / dL krve pacienta.

Samotný test je velmi citlivý, protože hladina C-rekativního proteinu dynamicky kolísá v průběhu onemocnění. Nejvyšší hladina CrP koreluje s maximální hladinou isoenzymu kreatinkinázy s tím rozdílem, že zvýšené CrP pozorujeme o 1-3 dny později. Před testem je nutné pacientovi vysvětlit faktory, které mohou způsobovat jisté druhy interferencí. Kouření a některé druhy drog mohou falešně zvyšovat hladinu C-reaktivního proteinu. Zvýšené testy se obejvují i u pacientů kteří mají vysoký LDL cholesterol (*low-density-lipoprotein)* (Pagana, 2010)

2.2.2 **Mikrobiologické vyšetření zaměřené na přímý průkaz původce onemocnění**

2.2.2.1 Mikroskopie

Některé materiály odebrané při podezření na infekci respiračnho traktu se rutinně vyšetřují k určení validity mikroskopicky (sputum, BAL) Již na základě tohoto předběžného vyšetření a klinického stavu pacienta je možné zahájit antimikrobiální terapii dříve, než jsou dostupné výsledky kultivačního vyšetření. K vyšetření zhotovujeme preparát barvený dle Grama, v současnosti převážně v barvících automatech. Sledujeme výskyt organizmů a popřípadě počet a vzhled leukocytů. (Scharfen, 2013)

2.2.2.2 Kultivace

Kultivace, je jednou ze základních vyšetřovacích metod. Pro její účely existuje velké množství selektivních, diagnostických a selektivně-diagnostických půd. Průkaz jednotlivých mikrobiologických patogenů je na správné kultivaci do značné míry závislý a na chybném provedení může ztroskotat.

Jednou z hlavních podmínek správného provedení kultivace je zachování sterility půdy. Tím dosahujeme přípravou půdy ve sterilních nádobách a aseptickou prací.

Na kultivační média nanášíme nejčastěji odebraný materiál mikrobiologickou kličkou nebo vatovou tyčinkou. Kultivační média můžeme rozdělit do dvou základních skupin, dle jejich konzistence na pevné (agarové) půdy a tekuté bujóny. Pevné půdy se dnes připravují nejčastěji ztužením agarového základu a přidáním příměsí, které zajišťují výživu a růst kolonií v Petriho miskách nebo šikmé agary ve zkumavkách. Způsob, jakým nanášíme materiál na tento typ půd nazýváme očkování. Tekuté půdy představují rozmanité druhy bujónů a cukrové půdy ve zkumavkách. V tekutých půdách dochází k lepšímu množení patogenů díky snadnějšímu přístupu patogenu k živinám, ale z vytvořeného zákalu ve zkumavce nejsme schopni určit jednotlivé druhy patogenů.

Pro správný růst mikroorganismů jsou důležité kultivační podmínky:

Teplota – kultivace probíhají v termostatech o obvyklé teplotě 37°C (existují výjimky)

Plynné prostředí – respektujeme vztah mikroorganismu ke kyslíku (aerobní kultivace, mikroaerofilní kultivace a anaerobní kultivace)

Dostatek živin a dalších biogenních prvků (obsaženy v kultivační půdě)

Optimální pH – vhodný rozptyl je 7,2 – 7,4

Voda

Dělení kultivačnch medií s uvedenými příklady jednotlivých půd (bakteriologie, mykologie)

- Základní půdy: tekutý bujon, peptonová voda, základní pevný živný agar (masopeptonový)
- Obohacené půdy: krevní agar, čokoládový agar, Levinthalův agar, půda Bordetova-Gengouova, McCoyova půda, Löwenstein-Jensenova půda, Sabourardův agar
- Selektivní půdy: selenitová půda, alkalická peptonová voda, G.C. agar
- Diagnostické půdy: chromogenní půdy, cukrové půdy, pestrá řada, agar dle Hajny, CLED půda, biochemický klín
- Selektivně diagnostické půdy: Endova půda, McConkeyho půda, XLD půda, CIN půda (Votava, 2010)

Kultivace virů

Protože viry jsou schopny přežití pouze v hostitelské buňce jejich kultivace vyžaduje přítomnost živých souhrnně označovaných jako tkánově kultury. V běžných virologických vyšetřeních využíváme nejčastěji přímo buněčných kultur. Buňky mohou být přímo odebrané za účelem následné kultivace, nebo mohou být pěstovány v laboratorních podmínkách po několik pasáží nebo jsou pěstovány nekonečně dlouhou dobu.
(Melter, 2014) Jako přklady buněčných kultur využivaných pro stanovení respiračních virů je možné uvést LMP buňky, VERO buňky, MDCK buňky. (Interní zdroj oddělení Mikrobiologie FN Plzeň)

2.2.2.3 Vybrané identifikační testy

Některé vykultivované kmeny vyžadují bližší dourčení. To se provádí mimo jiné i biochemickými identifikačními testy. Obecným principem biochemických testů je biochemická změna substrátů v určité metabolity činností patogenů. Ne všechny biochemické jevy jsou viditelné a proto se v některých případech využívají chemické indikátory.

Katalázový test: principem je štěpní peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Štepení je umožněno enzymem katalázou. V případě pozitivního testu dojde ke tvoření bublinek. Test se využívá k odlišení katalázapozitivních stafylokoků od katalázanegativních streptokoků, popřípadě enterokoků.

PYR-test: celým názvem test pyrrolidonylpeptidásové aktivity. Test se provádí na úzkém plastovém proužku na jehož konci je reakční ploška napuštěná substrátem. Pozitivita testu je dána červeným zbarevním reakční plošky po několikaminutové inkubaci a přidáním

činidla. Činidlo je žluté barvy a tak negativní výsledek je odečtení žluté barvy plošky. Pozitivní test můžeme vidět například u *Streptococcus pyogenes*, je to způsob jeho odlišení od ostatních streptokoků. (Votava, 2010)

Plazmakoagulázový test: využívaný k například rozlišení rodu *Staphylococcus.* V přítomnosti *Staphylococcus aureus* dochází díky proteinu plazmakoagulázy ke tvorbě pevného fibrinového vlákna v králičí citrátové plazmě. *Staphylococcus epidermidis* koagulum netvoří, je koaguláza negativní. (Bednář, 1996)

CAMP test: jedním z možných odlišení beta-hemolytických streptokoků. Využívá se k odlišení *Streptococcus agalatiae* od *Streptococcus pyogenes*. Test provádíme na krevním agaru přidáním tzv. Stafylokokové čáry k odebranému materiálu a pozorujeme zónu hemolýzy. V případě přítomnosti *Streptococcus aglatiae* dojde ke zvětšení hemolytické zóny a vytvoření typické mašličky. *Streptococcus pyogenes* zónu hemolýzy nezvětšuje. (Bednář, 1996)

Bacitracinový test: nám pomáhá odlišit β-hemolytické streptokoky. Test se provádí na agarové půdě s přidaným diskem bacitracinu. *Streptococcus pyogenes* reaguje na přítomnost disku zónou inhibice kolem disku. (Bednář, 1996)

Optochinový test: je založený na obdobném způsobu jako bacitracinový test. Na naočkovaný krevní agar se vloží disk napuštěny optochinem a v případě citlivosti bakterie na optochin dojde k vytvoření zóny inhibice, jako v případě *Streptococcus pneumonia.* (Bednář, 1996)

MS MALDI TOF: : nejmodernější identifikační system, který v posledních létech plně nahradil většinu výše zmiňovaných identifikačnícxh testů. Principem metody je stanovení molekulové hmotnosti zkoumaného vzorku ionizací laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detekcí doby letu trubicí detektoru. Výsledkem testu je hmotnostní spektrum, které je specifické pro jednotlivé druhy mikroorganismů. Naměřené spektrum se následně srovnává s profily v referenční databázi a vyhodnocuje se. Výhodou metody je jednoduchá příprava vzorku a rychlost identifikace. Klasická identifikace výše popsasnými testy trvala od 8 do 24 hodin, identifikace touto metodou trvá bez kultivace řádově minuty. (Interní zdroj FN Plzeň oddělení bakteriologie)

2.2.2.4 Průkaz antigenu

Obdobně jako tělní buňky nesou i patogeny na svém povrchu různé antigeny (Ag), které poukazují na jejich původ a umožňují jejich detekci. Antigeny se prokazují na principu serologických testů. Ty spočívají v reakci Ag s Ab, nebo-li antisérem o přesně

definovaném složení. Vznik komplexu antigen-protilátka je dále detekovaný různými metodami. Například pneumokoky se prokazují pomoci antiséra proti polysacharidovému pouzdru této bakterie. (Schindler, 2010)

2.2.2.5 Genetické metody

Genetické metody se používají v případech, kdy je nějakým způsobem znemožněna kultivace nebo je žádoucí získat výsledek rychle. Může docházet k tomu, že je patogen pomalu rostoucí nebo kultivačně velmi náročný. Takovým příkladem mohou být například mykobakterie, legionely, nebo někteří viroví původci. Další indikací k použití genetických metod může být dodání malého množství vzorku nebo požadování průkazu genu pro určitý toxin či gen rezistence na antibiotickou terapii. K těmto účelům se nejčastěji používají následující metody:

Polymerázová řetězová reakce PCR

Díky této metodě je možno amplifikovat jakoukoliv část DNA, ke které jsou nasyntetizované komplementární úseky - *primery*. Tyto primery nasedají na úseky DNA a dochází k jejich amplifikaci. Nasednutí primerů předchází denaturační faze. Jedná se o degradaci dvouvláknové DNA za vysokých teplot, přibližně 96°C . Samotné nasednutí primerů probíhá v prostředí o zhruba 55°C a k množení, nebo-li amplifikaci požadovaného úseku, dochází za teplot okolo 72°C. (Melter, 2014)

Hybridizace DNA

Genetická informace (DNA) je tvořena dvojvláknovou molekulou, dvoušroubovicí. Vlákna jsou složena z jednotlivých deoxyribonukleotidů, které se s druhým vláknem spojují na základě komplementarity bazí. Jednotlivé báze jsou připojeny k sobě pomocí vodíkových vazeb, relativně slabých nevazebných interakcí mezi molekulami. Ačkoliv jsou vodíkové vazby brány jako ty slabé, molekula DNA je stabilní díky vysokému počtu těchto nevazebných interakcí. Vlákno dvoušroubovice je možné „rozplést‘‘ a to pomocí denaturace. Jedná se o působení vysokých teplot, nebo například velmi alkalického prostředí na molekulu. Molekula se po rozpletení může opět spojt a to snížením teploty, nebo změnou pH prostředí ve kterém se právě nachází na méně alkalické.

Hybridizace nukleových kyselin je známá a často využívaná metoda pro hledání předem jíž rozklíčovaného úseku DNA ve vzorku pacienta. (Kuthan, 2009) Velmi častá laboratorní varianta hybridizačních metod je takzvaná *in situ* hybridizace DNA. Principielně je tato metoda založená na přidání sond DNA do denaturovaného vzorku DNA. Pro provedení tohoto vyšetření je důležité aby byla jednotlivá vlákna DNA rozpojena. Sondy jsou předem

připravené krátké úseky DNA, které jsou komplementární k hledanému úseku DNA. Po přidání sond do vzorku dojde k jejich navázání na jednovláknovou DNA. Jednotlivé sondy bývají fluorescenčně značeny. Usnadňuje to tak jejich detekci po navázání a promytí vzorku ve fluorescenčním mikroskopu. (Michálková, 2005)

Sekvenační metody

Určují sekvenaci jednotlivých nukleotidů v genetické informaci. Dřívé byla metoda založena na chemickém, nebo enzymatickém štěpení jednotlivých bazí, avšak dnes je tato metoda jíž automatizována. Automatizátory značí jednotlivé báze fluorofory, které po proběhlé inkubaci a osvětlení emitují jednotlivé barvy a jsou poté detekovány fluorescenčním mikroskopem. Pozorovány jsou úlomky DNA na agarózovém gelu.

Sangerova enzymatická metoda je založena na principu zastavení syntézy DNA v okamžiku, kdy dideoxynukleotid je vložen na místo normálního deoxynukleotidu. Dideoxynukleotid se od deoxynukleotidu liší absencí hydroxylové skupiny na třetím uhlíku. Jeho zařazením dojde k zastavení syntézy. Detekce je umožněna primery ve čtyřech zkumavkách se sekvnační směsí, která obsahuje fluorescenčně značený jeden dideoxynukleotid. Jednotlivé úseky se řadí dle délky pomoci gelové elektroforézy. (Passarge, 2019)

2.2.3 Vyšetření zaměřené na nepřímý průkaz původce onemocnění

2.2.3.1 Sérologické vyšetření

V mikrobiologických laboratořích bývají nejčastěji využívány aglutinační metody, ELISA stanovení a komplement fixační reakce. Jejich konkrétní využití napříč laboratořemi se může lišit avšak základní princip stanovení zůstává stejný. Základním stavebním kamenem sérologických reakcí je vazba antigenu a protilátky za následného vytvoření detekovatelného komplexu.

Komplement fixační reakce (KFR) je tedy jedno z hojně využívných stanovení. Nezbytnou součástí této rekace je přítomnost komplementu, který se navazuje na případně vzniklý komplex antigenu a protilátky. Samotná vazba komplementu není viditelná a pro její vizualizaci se do rekace přidává indikátor, tedy hemolytický systém v podobě beraních erytrocytů senzibilizovaných králičími protilátkami proti krvinkám. V takovéto reakci můžou nastat dvě situace. V první situaci se jedná o takzvanou zábranu hemolýzy. K tomu dojde, pokud se komplement naváže na komplex antigenu a protilátky. Při nastání druhé situace, kdy tedy není přítomná některá z reagujících složek (například detekovaná protilátka) dojde k viditelné hemolýze indukované komplementem. (Votava, 2010) Jedním

z negativ tohoto stanovení je jeho nízká specifita a to povětšinou pouze na úrovni například rodů bakterií, neumožňuje je tedy rozlišit na jednotlivé druhy.

V České republice jsou nejvíce využívány metody **ELISA**. Jedná se o jednu z imunoenzymatických metod, kdy jedna z reakčních složek (antigen nebo protilátka) je navázána na pevném povrchu , kterým může být například dno mikrotitrační destičky, polystyrenová kulička, nebo dno zkumavky. Má mnoho druhů a v mikrobiologických laboratořích je nejčastěji využívána nepřímá ELISA, označována jako sendvičová. Její princip spočívá v navázání antigenu na protilátku fixovanou na pevné fázi, následném přidání značené protilátky konjugátem. Konjugát je detekovaný díky substrátu, který barevnou rekaci umožní. Samotná detekce je pováděna měřením absorbance roztoku. (Votava, 2010) Obdobně jak KFR nemá dostatečnou specifitu k určení konkrétního patogena, často tedy určíme pouze například rod bakterií. (Hejnar, 2001)

HIT, neboli hemaglutinační inhibiční test je druhým nejhoněji využívaným sérologickým testem ve virologii. Smysl testu spočívá v inhibici hemaglutinace díky navázání protilátky na hemaglutinační virus, který by jinak zapříčinil anglutinaci erytrocytů. Test je vhodný pro užití detekce protilátek i antigenu. HIT je používán též ke stanovení titru protilátek. Oproti KFR vykazuje HIT vyšší specifitu a umožňuje tedy přesnější stanovení chřipkových virů. (Votava, 2010)

3 VYBRANÍ BAKTERIÁLNÍ PŮVODCI RESPIRAČNÍCH INFEKCÍ

3.1 Rod Haemophillus

Rod *Haemophillus* je charakteristický svou potřebou kultivace na speciálních obohacených půdách o růstové fakotry. Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky, které většinou bývají přirozenou mikrobiální flórou. Mezi potencionálně patogenní zástupce tohoto rodu patří *Haemophillus influenzae, H. parainfluenzae* nebo *Haemophillus durcreyi.*

3.1.1 **Haemophillus influenzae**

Morfologie: gram negativní, drobné, krátké, nepohyblivé bakterie, kolonie bývají drobné kruhové nebo vláknité. Některé kmeny *H. influenzae* jsou kryti polysacharidovým pouzdrem. Polysacharidové pouzdro má typickou antigenní strukturou, díky které mohou být tyto kmeny děleny do skupin označovaných písmeny a-f. (Votava, 2010)

Laboratorní diagnostika: materiálem bývají nejčastěji nasofarygeální výtěry, nebo sputum určené k následné kultivaci. K určení validity sputa se používá mikroskopický preparát a pak následuje kultivace. (Scharfen, 2013)

Kultivace: laboratorně bývají pěstovány na čokoládovém agaru. Kolonie jsou velmi drobné. (Bednář, 1996) Vykazují fenomén satelitismu - schopnosti růstu kolonií *Haemophillus influenzae* v zóně kolem stafylokoků. Díky tomuto fenoménu se na plotny při rozočkování přidělává stafylokoková čára. (Bednář, 1996)

Patogenita: bakterie způsobují různě závažná onemocnění od běžných infekcí dýchacích cest, ale i meningitidy, konjunktivitidy, sinusitidy. Kojenci a batolata jsou ohrožení onemocněním epiglottitis, nebo-li zánětu příklopky hrtanové s hrozícím dušením. Obecně kmeny opouzdřené i bez pouzdra, mohou být příčinou zánětů středního ucha nebo například hnisavých rhinitid. (Votava, 2010)

3.2 Rod Streptococcus

Streptokoky jsou nepohyblivé gram pozitivní koky shlukující se do dvojic až drobných řetízků. Podle hemolýzy na krevním agaru je dělíme na streptokoky alfa, beta a gama . (Votava, 2010) Streptokoky alfa mají částečné hemolytické vlastnosti a pozměňují barvu krevního agaru v okolí jejich růstu na světle zelenou. Výsledkem je tzv. viridace. Streptokoky beta mají kolem svých kolonií patrné zhemolyzované zóny v krevním agaru. Poslední skupina, streptokoky gama jsou bez hemolýzy. Rod *Streptococcus* je možné dále

rozlišovat na jednotlivé kmeny dle přítomnosti skupinově specifického polysacharidu C ve stěně bakterie. (Schindler, 2010) Polysacharid C má bohatou antigenní strukturu a umožňuje tedy rozdělení streptokoků do jednotlivých kategorií. Jednotlivé sérologické skupiny jsou označovány písmeny A-Z (u člověka se vyskytují A-H). U pneumokoků a viridujících sterptokoků polysacharid C není přítomen (Votava, 2010)

3.2.1 **Streptococcus pneumoniae**

Morfologie: opouzdřené bakterie, často tvoří diplokoky, tvarem připomínají lancetu. Gramovým barvením je označujeme za grampozitivní. Polysacharidové pouzdro chrání bakterie před fagocytózou a je i zdrojem virulence tohoto patogena.

Laboratorní diagnostika: existuje široká škála možností detekce této bakterie jako například vyšetření hemokultur, průkaz antigenů. (Schindler, 2010) *Streptococcus pneumonie* je sice pyogenní streptokok, ale od ostatních se liší absencí polysacharidu C v buněčné stěně (Tertti, 1988)

Kultivace: kultivují se ve vlhkém prostředí na obohacených krevních agarech. Za anaerobních podmínek tvoří na krevním agaru β-hemolýzu. (Bednář,1996) V případě, že *Streptococcus pnemoniae* tvoří kolem buněk pozdro, připomínají kolonie kapky oleje na agaru, nebo drobné mističky. Pokud k tvorbě pouzdra nedochází, bývají kolonie k nerozeznání od ostatních viridujících streptokoků.

Patogenita: Jsou nejčastějšími patogeny vyvolávající záněty plic, pneumonii. Proti nejčastějším typům je možnost ochrany vakcinací. *S. pneumoie* je původcem jak krupózní pneumonie, tak brochopneumonie. Oba typy pneumonií se léčí antibiotiky, avšak díky celkové zátěži organismu a agresivitě nemoci zaznamenáváme i úmrtí pacientů. Hlavně u novorozenců, kojenců nebo naopak u starších pacientů. Dalším velmi závažným oneocněném způsobeným *S. pneumonie* je hnisavá pneumokoková meningitida. Přičinou proniknutí infekce do CNS můžou být například fraktury *basis crania*. Někteří lidé mohou být přenašeči *Streptococcus pneumonie* v nosohltanu a v případě další infekce může hrozit vniknutí bakterie do plic a rozvoj pneumonie. (Votava, 2010)

3.2.2 **Streptococcus pyogenes**

Morfologie: grampozitivní kok tvořící řetízky různých délek (Bednář, 1996)

Laboratorní diagnostika: opírá se především o přímý kultivační průkaz. Nepřímá diagnostická metoda zahrnuje průkaz protilátek v séru proti typickým streptokokovým antigenům jako je například proti streptolysinu. (Bednář, 1996)

Kultivace: kultivace se povádí na krevních agarech, ačkoliv je na kultivaci poměrně náročný. Kolonie na krevním agaru dosahují průměru kolem 0,5 mm. Jedná se o streptokoky typu beta, tedy kolem jejich kolonií se nachází oblast úplné hemolýzy.

Patogenita: *Streptococcus pyogenes* je zodpovědný za hnisavá onemocnění s přidruženými příznaky působení toxinů bakterie. Místem vstupu bakterie do organism bývá nejčastěji dutina ústní a tím pádem nejčastější zasaženou oblastí bývají mandle. Bakterie je poměrně odolná vůči fagocytóze. Tato vlastnost je umožněna přítomností M-proteinu. Onemocnění způsobené *S. pyogenes* je především akutní tonsilofaryngitida. Pokud nemoc vyvolal kmen, který produkuje spálový toxin objevují se na tělech pacientů typické začervenalé mapy na kůži.

U malých dětí se častěji vyskytuje impetigo. Jde o povrchové hnisavé onemocnění pokožky. Typické jsou strupy pokryté puchýřky naplněné žlutým hnisem. Hnisavá ložiska díky přítomnosti *S. pyogenes* mají tendenci se šířit dále po tělě. V neléčeném případě nakaženým pacientům může hrozit i celkový toxický šok organizmu. (Votava, 2010)

3.3 Rod Staphylococcus

Rod *Staphylococcus* se spolu s ostatními katalásapozitivními koky řadí mezi grampozitivní. koky. V mikroskopu je můžeme pozorovat ve shlucích připomínajících hrozny. Stafylokoky obvykle netvoří pouzdra ani spory nebo bičíky. (Schindler, 2010) V laboratorní praxi se rod *Staphylococcus* dělí nejčastěji podle jejich schopnosti koagulovat plazmu na koaguláza pozitivní, jako například *S. aureus* a koaguláza negativní stafylokoky, např. *S. epidermidis*. Koaguláza negativní stafylokoky nebývají pro člověka typicky patogenní a jsou často součástí běžné mikroflóry. Často se jedná o oportunní patogeny. Mohou ale osidlovat povrchy předmětů užívaných v lékařství jakými jsou například intravenózní katétry, kloubní náhrady nebo umělé srdeční chlopně. *S. epidermidis* může být zodpovědný za rozvoj močových i krevních infekcí. Tyto infekce však často zapadají do infekcí spojených se Zdravotní péčí. (Votava, 2010)

3.3.1 **Staphylococcus aureus**

Morfoloie: zlatý stafylokok své jméno získal pro typickou nazlátlou barvu svých kolonií. Je typickým patogenním zástupcem stafylokoků. (Votava, 2010) Gramovým barvením se barví do tmavé modrofialové. *Staphylococcus aureus* je nositelem a producentem celé řady faktorů virulence. Produkuje cytoliziny, které dokáží poškozovat tkáně (hemolyzin alfa,

beta, gama a delta), leukocidin (ochrana stafylokoků před leukocyty), exfoliantiny (vyvolávají vznik obrovských puchýřů a olupování velkývh ploch kůže). Zástupcem jedním z velmi nebezpěčných toxinů zlatého stafylokoka je take toxin TSST 1 nebo-li toxin způsobujísí syndrom toxického šoku organismu. Tento sydrom je doprovázen vysokými horečkami a patrným orgánovým toxickým zasažením. (Schindler, 2010)

Laboratorní diagnostika: k vyšetření bývají posílány nasofaryngeální nebo výtěry z tonzil, vzorky sputa, moče nebo krve. Základem laboratorní diagnostiky je kultivace, hemokultivace, sledování hladiny produkovaných toxinů a při testování biochemické aktivity sledování tvorby plazmakoagulázy.

Kultivace: při kultivaci roste bez problémů a obecně nebývá kultivačně náročný. Jednotlivé kolonie nabývají velikostí okolo 1-3 milimetrů. Kolem vykultivovancýh kolonií bývá patrná beta hemolýza. (Votava, 2010)

Patogenita: Hnisavá onemocnění postihují kůži (impetigo, karbunkl, furunkl či působí infekce ran), z vnitřních orgánů postihují často plíce (bronchopneumonie), srdce (endokarditidy) nebo postihují celý organismus (sepse). Díky schopnosti tvořit enterotoxin může po požití potravy s jeho obsahem vyvolat alimentární intoxikaci. Velkým problémem pro lidský organismus, je poměrně vysoká rezistence vůči antibiotikům. Některé kmeny jsou schopny produkovat penicilinázu (není proto citlivý na penicillin) a tak toto antibiotikum musí být nahrazováno jinými – např. oxacilinem nebo meticilinem. (Schindler, 2010) Některé kmeny se však dokáží adaptovat i na ně a odolnost vůči meticilinu může vyústit ve výskyt *Methicilni-resistant Staphylcoccus aureus* - kmeny MRSA. Tyto kmeny mohou mít nozokomiální původ, především pak u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Záleží vždy na úrovni opatření proti jejich výskytu nebo zkušenostech se zacházením s takovými pacienty. Jejich výskyt se tedy velmi liší v jednotlivých zdravotnických zařízeních a někdy na jednotlivých odděleních. (Kepler, 2004)V současnosti jsou známi i vankomycin rezistentní kmeny *S. aureus.* (Votava, 2010)

3.4 Rod Mycobacterium

Rod *Mycobacterium* patří mezi acidorezistentní bakterie. Gramovým barvením se neobarví. Tento fakt je dána vysokým obsahem tuků, přesněji tuhých vosků, v jejich buněčných stěnách. (Schnidler, 2010) K jejich barvení se používá Ziehl-Neelsenova barvicí metoda. Výsledkem jsou jasně červeně obarvené bakterie na zeleném pozadí. (Githui, 1993) Jejich další zvláštností je dlouhá doba kultivace u obligátních patogenů, přesněji se jedná i o několik týdnů. (Schindler, 2010) Jejich diagnostika probíhá přímým průkazem a to nejčastěji ve specializovaných laboratořích. (Votava, 2010) Patogeny, kteří

mají mnoho společných vlastností s rodem *Mycobacterium tuberculosis* souhrnně označujeme jako *mycobacterium tuberculosis complex*. Shodují se nejen v onemocnění, které způsobují ale i v dalších parametrech jako je např. doba růstu a náročnost kultivace. (Schindler, 2010)

3.4.1 **Mycobacterium tuberculosis**

Morfologie: *Mycobacterium tuberculosis,* označováno zkratkou MTB, jsou krátké nepohyblivé tyčinkovité bakterie. Gramovým barvením se díky acidorezistenci nebarví. (Votava, 2010)

Laboratorní diagnostika: vzorky jsou vždy vyšetřovány mikroskopicky, kdy se preparát barví metodou Ziehla Neelsena, klasickou kultivací, zrychlenou kultivací, stanovením interferonu gama nebo stále častěji metodou PCR.

Kultivace: jejich růst je pomalý a proto i kultivace je časově náročná. *M. tuberculosis* se kultivuje na několik druhů půd. Výsledky se odečítají za 1, 3, 6 a 9 týdnů. Viditelné kolonie mají nažloutlou barvu a bývají patrné až po třech týdech kultivace. V posledních létech se používají i urychlené kultivační postupy založené na průkazu metabolických produktů mykobakterií během jejich růstu na tekutých půdách. K signalizaci o růstu dochází v průměru za 10 až 14 dnů. (Bednář, 1996, Votava, 2010)

Patogenita: MTB je původce tuberkulózy, nebo dle staršího názvu souchotiny. V současnosti je tuberkulóza veliký problém hlavně rozvojových států. Onemocnění je považováno za třetí nejrozšířenější infekční chorobu. Jako jednu z obran proti tomuto onemocnění bylo uzákoněno v roce 1948 povinné hlášení tuberkulózy, aby bylo možno monitorovat výskyt jednotlivých případů, epidemií a její šíření v populaci. Vysoce ohroženou skupinou lidí jsou pacienti s diagnostikovaným onemocněním AIDS, jedná se až o 175 krát větší riziko. (Homolka, 2017)

Příznaky onemocnění nebývají vždy typické. Projevy závisí od velikosti infekční dávky a na odolnosti organismu. Během prvních dvou let po nákaze onemocní asi jen 5 % pacientů. Téměř vždy jsou postiženy plíce. Pacienti vykazují obvykle velkou únavu, dusivému suchému kašli, kašli s příměsí krvavého sputa. Dlouhodobé vyčerpání pacienta vede ke kachexii a obecně velkému neprospívání nemocných s detekovaným nízkým okysličením krve. K diagnostice se využívají I zobrazovací metody. Z rentgenových snímků bývají patrné neohraničené nekrózy plic s kavernami. Onemocnění se může z plic rozšířit do ostatních částí těla krevní cestou a způsobuje tak vznik lézí v těle pacienta. Často i několik let

po primární tuberkulóze. Mimo plíce bývají často zasaženy kosti, pleura, urogenitální trakt či kůže. (Bártů, 2008)

3.5 Rod mycoplasma

Rod *Mycoplasma,* stejně se vyznačuje absencí bunečné stěny. Na povrchu mají pouze měkkou membránu, která jim umožňuje větší tvarovou variabilitu než jakou většinou mají ostatní bakterie s buněčnou stěnou. (Schindler, 2010) Absence buněčné stěny je dělá též rezistentní vůči beta-laktamovým antibiotikům.

3.5.1 **Mycoplasma pneumoniae**

Morfologie: díky nepřítomnosti buněčné stěny jsou mykoplasmata charakteristická rozmanitou velikostí a tvary, tvoří kokovité i vláknité kolonie s možným větvením. Gramovým barvením můžeme pozorovat lehké červené zabarvení, tedy slabý gramnegativní výsledek.

Laboratorní diagnostika: pro obtížnou kultivaci se používají v rutinní diagnostic hlavně sérologická stanovení. Vyšetření *M. pneumoniae* bývá součátí panelu vyšetření na respirační viry. Používá seč hlavně metoda KFR, nejlépe v párovém vyšetření vzorků. Další možnou detekcí hojně využívanou v laboratořích může být například ELISA metoda. (Votava, 2010)

Kultivace: kultivujeme na půdách obohacených peptonem, kvasničním extraktem a 20% nativním sérem za vyšší tense CO^2. (Bednář, 1996)

Patogenita: *Mycoplasma pneumonie* je znám jako původce tracheonbronchitidy, zánětu dolních dýchacích cest a atypických pneumónií. Nákaza probíhá po velmi těsném kontaktu s nemocným, protože samotná bakterie nemá příliš vysokou odolnost ve vnějším prostředí. (Votava, 2010) Jakýkoliv typ pneumonie je brán za velmi závažné onemocnění a představuje velká riziko pro pacienta, které může za určitých podmíknek končit i smrtí. Přirozeně ohroženou skupinou lidí jsou malé děti a staří lidé s věkem zhruba nad 50 let, riziko přináší také současně probíhající chřipkové onemocnění, nebo hospitalizace. (Kašák, 2004) Mezi prvotní příznaky počítáme kašel, ztížené dýchání, lékařem slyšitelné loupání při nádechu. Zápal plic je typický rychle se rozvíjejícími mnoha příznaky. Mezi další patří horečka, únava organismu nebo zhoršení příjmu potravy. Na rentgenu plic je pak pozorovatelný zánět. Při diagnózee je důležité přesně určit původce pneumonie a rozsah postižení plic. (Vančíková, 2008)

3.6 Rod Corynebacterium

Jedná se o grampozitivní nebo gramlabilní tyčinky hůlkovitého, nebo kyjovitého tvaru. Dělí se podélně a v koloniích jsou k sobě připevněny svými delšími stranami a vytvářejí tak charakteristické tvary pozorovatlné pod mikroskopem

3.6.1 **Corynebackterium diphteriae**

Morfologie: typický grampozitivní až gramlabilní tyčinkovitý pathogen, který na sérových půdách tvoří barevně odlišené Erntsova- Babesova granula. *Corynebactrium diphtheriae* produkuje difterický toxin, způsobuje onemocnění záškrt a je možné se proti tomuto onemocnění očkovat.

Laboratorní diagnostika: odebraným materiálem bývají výtěry, nebo krev a následná diagnostika se opírá především o kultivaci, průkaz difterického toxinu, mikroskopické zhodnocení nebo průkazu protilátek

Kultivace: probíhá na obohacených sérových médiích a selektivně diagnostických půdách obohacených teluričitany. (Votava, 2010)

Patogenita: onemocnění difterie, neboli záškrtu se vyznačuje suchým kašlem. Toxin, který proniká organismem může způsobovat obrnu patra nebo i srdeční potíže. Nejčastějšími formami diftérií je difterická angina a difterický krup. (Bednář, 1996)

3.7 Rod Legionella

Tento rod bakterií řadíme mezi gramnegativní tyčinky, ačkoliv jsou špatně barvitelné. Jsou fakultativně anaerobní. *Legionella* je rod z velmi různorodé skupiny, které spojuje náročná kultivace. Kultivují se na obohacených médiích. *Legionella* je původcem velmi závažných pneumónií. Často se tyto patogeny vyskytují ve vodním prostředí - užitkové a průmyslové vodě, rzi, vodních nádržích nebo klimatizačních zařízeních. (Votava, 2010)

3.7.1 **Legionella pneumophila**

Morfologie: štíhlé tyčinky obvykle tvořící delší vlákna se dvěma i více bičíky. Jsou pohyblivé a ve stěně obsahují typické 2,3-dihydroxy mastné kyseliny.

Laboratorní diagnostika: vyšetřovaným materiálem je nejčastěji materiál z respiračního traktu. Možnými vyšetřovacími způsoby jsou kultivace na obohacených médiích, průkaz antigenu v moči a průkaz genomu. V minulosti používaný průkaz protilátek se již nepoužívá, protože má nízkou vypovídací hodnotu o stavu onemocnění.

Kultivace: probíhá na půdách obohacených o železo, aktivní uhlí, kvasničný extrakt a aminokyselinu cystein. Kolonie mají leskle šedou barvu a okrouhlý tvar. Velikost odpovídá přibližně 1 mm. Na klasickém krevním agaru legionely nerostou. (Bednář, 1996)

Patogeneze onemocnění: onemocnění způsobené *L. pneumophila* postihuje většinou imunosuprimované jedince. Bakterie se přenášejí aerosolem. Mohou způsobit závažný zánět plic, dříve nazývaný legionářská nemoc. Díky možnému výskytu ve vodovodní vodě je zvýšené riziko vzniku onemocnění ve zdravotnických zařízeních. (Carratla, 1994)

3.8 Rod Bordetella

Zástupci rodu *Bordetella* jsou obecně velmi podobné haemofilům. (Schindler, 2010) Pod mikroskopem je můžeme pozorovat jako malé opouzdřené kokobacily. Jsou původci velmi nebezpečného onemocnění pertuse, neboli dávivého kašle, který vešel ve známost jako černý kašel. Tento rod bakterií je náročný na kultivaci, je nutné použít půdy obohacené o aktivní uhlí. Přítomnost aktivního uhlí neutralizuje jinak toxické látky v běžném agaru, které znemožňují kultivací bordetel. Existují tři hlavní zástupci bordetell a těmi jsou *Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis a Bordetella bronchiseptica.* (Schindler, 2010,Votava, 2010)

3.8.1 **Bordetella pertusis, Bordetella parapertussis**

Morfologie: krátká, nepohyblivá gramnegativní tyčinka

Laboratorní diagnostika: materiálem je výtěr nosohltanu. Před samotnou kultivací je výtěrovka lehce namočena v penicilinu a následně rozetřena po kultivační půdě. Namočení v penicilinu zabraňuje růstu grampozitivních organismů. Dalším možným laboatorním vyšetřením je průkaz protilátek. Stále častěji se využívá take metoda PCR. (Bednář, 1996)

Kultivace: klasickým kultivačním médiem je agar s defibrinovanou beraní krví s příměsí bramborového extraktu a glycerol. Kultivační doba se pohybuje kolem 36-72 hodin. Vykultivované kolonie se perleťově lesknou a vytváří úzkou zónu hemolýzy. (Bednář, 1996)

Patogenita: jedná se o striktně lidské patogeny způsobující černý kašel. Jako obrana proti tomuto onemocnění probíhá rozsáhlá vakcinace společnosti. Současný výskyt onemocnění je dán z největší části genetickou variací *Bordetella pertusis*. (Parkhill, 2003) onemocnění probíhá ve třech stádiích: katarální, paroxysmální a rekonvalescentní. Bakterie jsou odolné vůči fagocytóze, tedy i v případě pohlcení makrofágy mohou dále existovat a vzniká riziko nosičství. Vážnost tohoto onemocnění je dána blokací řasinek a následným poškozením sliznic dýchacích cest. Dále pak produkcí toxinu, který podporuje tvorbu hlenu. Pacienti

jsou nuceni vykašlávat obrovské množství hlenu a to vede k velkému vyčerpání až schvácenosti organismu. (Votava, 2010)

3.9 Rod Chlamydia

Zástupci rodu *Chlamydia* jsou označovány za intracelulární parazity, jsou závislí na hostitelských buňkách, protože jejich systém si neumí tvořit dostatek vlastní ATP. Strukturou jsou blízké gramnegativním bakterií avšak odlišuje je přítomnost většího množství lipidů ve stěně. Chlamydie obecně jsou nositely specifického termostabilního polysacharidového antigen, který umožňuje stanovení pomocí KFR. Nejvýznamnějsími zástupci jsou *Chlamydophila pneumonia, Chlamydia trachomatis, Chlamydophila psittaci,* které dohromady jsou součástí respiračního panelu virologického vyšetření v FN Plzeň.

3.9.1 Chlamydophila pneumoniae, Chlamydophila psittaci, Chlamydia trachomatis

Morfologie: mají speciální růstový cyklus v průběhu kterého mění svou morfologickou stavbu. Tento cyklus jim umožňuje zabudovat infekční částici, elementrání tělísko, do buňky hostitele. Tělísko se do buňky dostává obdobným procesem jakým je endocztóza. Tato tělíska se v hostitelské buňce množí až do chvíle kdy je buňka přeplněna těmito částicemi a dochází k jejímu prasknutí. Tělíska se vylijí z buňky a infikují další vnímavé buňky.

Laboratorní diagnostika: využívá přímý i nepřímý průkaz. Stanovení se mohou provádět ELISA metodou, PCR metodou, kultivací na tkáňových klturách nebo sérologickými metodami, popřípadě mikroskopií

Kultivace: není možná kultivace na pevných médiích, využívá s kultivace na tkáňových kulturách, kuřecích nebo myších. Kultivace trvá zhruba 48 hodin s pomocí centrifugace, která napomáhá průniku agens do buněk. Vykultivované agens se pro lepší viditelnost barví nebo fluorescenčně značí a následně jsou připravené preparáty mikroskopicky zhodnoceny. Jednotlivé druhy se liší tvarem a barvitelností inkluzí. *Ch. trachomatis* a *Ch. psittaci* tvoří kulatá tělíska a *Ch. pneumoniae* hruškovitá. Tělíska *Ch. trachomatis* se Lugolovým roztokem zbarví díky přítomnosti glykogenu. Tím se odlišují od ostatních druhů, které se Lugolovým roztokem nebarví. (Votava, 2010)

Patogeneze onemocnění: je odlišná u jednotlivých druhů.

Chlamydia trachomatis je původcem urogenitálních zánětů a je sexuálně přenosná. Existuje mnoho sérotypů a za záněty urogenitálního traktu jsou zodpovědné sérotypy D-K. U žen vyvolávají záněty endometria, děložního čípku a dělohy s hrozící možností vzniku chronických onemocnění. U můžu se jedná převážně o záněty nadvarlat, prostaty a močové

trubice. Celkově představují zhruba 50% všech urogenitálních nákaz. Jedním z možných rizik onemocnění bývá neplodnost, která se vyvíjí u žen jako důsledek opakovaných infekcí a přítomností jizev na sliznici.

Chlamydia pneumonia je typický respirační patogen, který je zodpovědný za vznik *sinusitid, bronchitid* a *pnemonií*. Přenos infekce je kapénkový a onemocnění lze těžko odlišit od dalších netypických pneumonií způsobných například legionelami. Infekce se snadno číří ve velkých kolektivech a běžně nemívají rizikový průběh.

Chlamydia psittaci je původcem *psitakózy*. Jedná se zvířecí patogen, který je přenosný na člověka a způsobuje nepříjemný suchý kašel a bolesti kloubů a horečku. Běžně napadá papoušky, nebo obecně ptáky a způsobuje u nich papouščí nemoc (psitakózu) respektive ornitózu. Přenáší se tedy ptačím peřím, exkrementy nebo prachem. (Bednář, 1996) (Votava, 2010)

4 VYBRANÍ VIROVÍ PŮVODCI RESPIRAČNÍCH INFEKCÍ

V našich podmínkách jejich výskyt jednoznačně převažuje nad bakteriálními onemnocněními tohoto typu a často se vyskytují v epidemiích.

Morfologie virů: V porovnání s bakteriemi jsou mnohem menší, jejich velikost se udává v řádu nanometrů. Jsou označovány nikoliv za buňky, ale za částice. Každá virová partikule se skládá z kapsidy a nukleové kyseliny. (Modrow, 2010) Kapsida je bílkovinný obal viru skládající se z jednotlivých kapsomer. Nukleoid je genetická informace uložená ve formě DNA nebo RNA. Na povrchu viru se může vyskytovat lipidový obal, který chrání vir před účinky vnějších vlivů. Viry, které mají nukleoid i kapsidu a jsou tedy zralými virovými částicemi, nazýváme viriony.

Reprodukce virů: Množí se pouze v hostitelských buňkách, což souvisí i s jejich náročnější kultivací na buněčných kulturách. (Schindler, 2010) Proces množení začíná stykem viru s buňkou a schopností do buňky vstoupit. Pak následuje pomnožení virových částic a obvykle končí lýzou buňky, vyplavením virů do okolí a napadáním dalších buněk v těle hostitele. (Modrow, 2010) Některé viry se vyznačují odlišným působením na lidský organismus, než je vyvolání klinických příznaků – v buňkách perzistují. Podle osudu hostitelské buňky tak mluvíme o abortivních, perzistentních nebo latentních infekcích. Abortivní infekce jsou takové, kdy reprodukční cyklus viru neproběhne až do konce a dochází k produkci nekompletních virů. Pokud je množící cyklus pozastaven a může změnou podmínek

v organismu dojít k jeho znovuobnovení hovoříme o latentních infekcích. A pokud dochází k tvorbě infekčních virionů, které mohou být předávány dalšímu potomstvu, jedná se o infekce perzistentní. (Votava, 2010) Pro nakažení pacienta musí najít virus vhodné místo průniku do orgnismu neboli bránu vstupu. Těmito branami jsou nejčastěji sliznice dýchacího nebo trávicího traktu, dalšími mohou být například různá místa vpichu od bodavého hmyzu nebo injekční aplikace. (Schindler, 2010)

4.1 Rhinoviry

Chrakteristické znaky: rhinoviry jsou jedny z velice hojně se vyskytujících patogenů patřící k čeledi *Picornaviridae*. Nemají obal a jejich genetická informace je tvořena jednovláknovou RNA molekulou. (Navrátil, 2017) Jejich ideální teplota pro množení je 33-35°C , což odpovídá teplotě v dutině nosní. (Bednář, 1996)

Patogenita: jsou původci onemocnění rhinitidy, rýmy. Branou vstupu infekce je nejčastěji nosohltan, léčba probíhá pouze symptomaticky, protože nebezpečí představuje přavážně pro malé děti. (Navrátil, 2017) U nich totiž dochází vlivem oslabení organismu k vytvoření prostoru pro nasednutí dalších infekcí jakými mohou být například pneumokokové nebo stafylokokové. (Schindler, 2010)

4.2 Koronaviry

Charakteristické znaky: zástupci skupiny *Coronaviridae* jsou široce rozšířené jednovláknové RNA viry, které na svém povrchu mají lipidový obal s výběžky. (Bednář, 1996) Laboratorní diagnostika vychází z vyšetření párových sér pomoci KFR, nebo metodou ELISA či PCR.

Patogenita: koronaviry způsobují převážne lehká až středně závažná respirační onemocnění, která jsou typicky přenosná ve větších kolektivech. Avšak je možné, že některé koronaviry mohou být zodpovědné za velmi závažné respirační onemocnění SARS. Virus tohoto respiračního syndromu je přenášen hlavně ptáky a netopýry a pro člověka je vysoce nebezpečný. Samotné onemocnění probíhá ve třech fázích. První fáze má chřipkovitý průběh doprovázený horečkou, myalgií, bolestmi v krku a dyspnoe. Po pominutí první fáze přichází fáze povrchového dýchání a rozvoji hypoxie. Třetí fáze je spojená s hospitalizací pacienta a často nutností jeho připojení na pomocné dýchací přístroje. (Payne, 2017)

4.3 Pneumovirus

Charakteristikcké znaky : patří do skupiny *Paramixoviridae,* která se dělí na dvě hlavní větve *Paramyxovirinae* a *Pneumovirinae* Do druhé patří i pneumovirus. Jednotliví zástupci se mohou v rámci kategorie *Pneumovirinae* dělit do dalších kategorií závisejících na jejich morfologii, složení genomu nebo produkovaných proteinech. (Knipe, 2007) Jsou to viry s genetickou informací v podobě RNA s charakteristickým obalem. Nezpůsobují hemaglutinaci ani nemají neuramindázovou aktivitu. (Bednář, 1996) Hlavním zástupcem je respirační syncitiální virus zodpovědný za onemocnění podobné bronchiolitidě.

Patogenita: typickým projevem onemocnění jsou bronchitidy s tvorbou syncytií. (Votava, 2010) Jde o soubuní mnohojaderných útvarů, které virus chrání před imunitním systémem organismu. RSV napadá hlavně novorozence a kojence a přenáší se kapénkami. (Bednář, 1996) Nákaza je možná i na novorozeneckých oddělních jako infekce spojená s lékařskou péčí. Pro dobrou prognózu je třeba rychlá detekce RSV a ta se provádí převážně sérologickými metodami. Onemocnění je zatím bez možné preventivní vakcinace. (Votava, 2010)

4.4 Čeleď Orthomyxoviridae

Charakteristické znaky : obecně se čeleď *Orthomixoviridae* vyznačuje jednovláknovou DNA rozdělenou do osmi (v případě influenzaviru typu C jen sedmi) segmentů. Kapsida viru je uložena v obalu s typickými výběžky hemaglutininu a neuramindázy. Díky hemaglutininům se viry snadněji přichytí k buňce ve které se následně mohou množit a může způsobovat i aglutinaci erytrocytů. Neuramindáza je glykoprotein, který dotváří subtyp viru a má enzymatickou aktivitu. (Timothy, 2007) Jednotlivé rody mají shodné vlastnosti i způsob replikace, odlišují se mikroskopickou stavbou jednotlivých antigenních bílkovin M1 a NP. (Schindler, 2010) Virus chřipky A má širokou škálu potenciálních hostitelů. Jsou mezi nimi například koně, ptáci, tuleni a lidé. Virus chřipky B má tuto diverzitu poněkud omezenější a typickým hostitelem je pro něj člověk nebo tuleň. Virus chřipky A i B mají velmi podobné, téměř shodné povrchové glykoproteiny složené z bílkovin HA a NA. Virus chřipky C se liší nejen menší počtem segmentů v RNA, ale i povrchovými bílkovinami. V tomto případě se jedná o HEF. Hostitelem může být člověk, nebo například prase. (Poon, 2007)

Patogenita: chřipka je typická sezónní nemoc, která se k nám vrací ve vlnách během roku. Každý rok dochází k jemné úpravě stavby antigenní struktury viru. Kromě toho může dojít k vytvoření naprosto unikátního podtypu viru. K tomuto jevu může dojít současným

pomnožením dvou lehce odlišných virů v jedné buňce hostitele. Branou vstupu nemoci je dýchací trakt, kde dochází k napadání řasinkového epitelu virem. Laiky bývá nesprávně zaměňováno s nachlazením nebo symptomaticky podobnými onemocněními dýchacího traktu. Chřipka má typický rychlý nástup onemocnění s respiračními symptomy jako například horečkou, bolestí svalů či kloubů. (Votava, 2010) U dětí a starých lidí hrozí nebezpečí druhotné bakteriální infekce. Vakcinace proti chřipce je možná, ale ochrana netrvá dlouho a jednotlivé vakcíny jsou velmi specifické co se týká antigenní struktury viru, tedy není účinná proti vice typům chřipky. Musí se opakovat každoročně. (Schindler, 2010)

4.5 Čeleď Paramyxoviridae

Charakteristické znaky: čeleď virů s cirkulující jednovláknovou RNA dosahující velikosti až 300 nm, což z nich dělá největší RNA viry. Na svém povrchu nesou obal s patrnými výběžky. (Votava, 2010) Vlákno RNA je na rozdíl od původců chřipky nesegmentované. (Schindler, 2010)

Patogeneze onemocnění: paramyxoviry jsou původci parachřipky. Virus má čtyři podtypy T1-T4 a napadá hlavně děti, kterým způsobuje dýchací infekce symptomaticky obdobné chřipce, nebo v případě velmi malých dětí může vyvolat bronchopneumonii. (Schindler, 2010) Infekce se šíří kapénkami a má krátkou inkubační dobu, kolem 2-3 dní. Vzácným a komplikovanějším onemocněním způsobeným paramyxovirem je pseudokrup, neboli otok sliznice hrtanu. (Bednář, 1996)

4.6 Herpes viry

Charaktristické znaky: jsou obalené DNA viry. Vyznačují se dlouhodobým přetrváním v organismu (latence) Jejich velikost se pohybuje kolem 100-200 nm. Herpes viry mohou být jak zvířecími, tak lidskými viry a tvoří tři hlavní skupiny *Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae* a *Gamaherpesvirinae.* Lidské herpesviry tvoří samostatnou skupinu virů HHV 1- 8.

Patogeneze oemocnění: nejčastější způsobená nemoc herpesviry je nemoc lidského oparu. Za něj je zodpovědný HSV1 a HSV2. HSV1 je způsobuje záněty dutiny ústní spojené s tvorbou puchýřků nebo *tonsilitidou.* Existuje i možnost opakovaného výsyktu.infekce ve formě *herpes labialis*. *HSV 2* napadá urogenitální trakt a je tak původcem genitálního oparu. HSV 1 I HSV 2 je možné laboratorně stanovit izolačními metodami díky jejich ochotné kultivaci na buněčných kulturách. (Bednář, 1996)

Cytomegalovirové infekce (HHV 5) probíhají převážně latentně. Nemoc se projevuje jen u imunosuprimovaných jedinců nebo batolat a kojenců. Typickým příznakem je zvětšení jater nebo sleziny doprovázené žloutenkou a kožním krvácením. Může dojít take k mírnějším poškozením centrální nervové soustavy, která se projevuje jako porucha psychického vývoje. Laboratorní diagnostika se opírá především o přímou metodu PCR. (Votava, 2010)

Patogeneze lidského herpes viru 6 není stále naprosto objasněná. HHV 6 se rozmnožuje v monocytech a lymfocytech. Prvotní infekce bývá latentní s vylučováním viru do slin. Následné infekce se mohou projevovat jako pneumonie, *gastroenteritidy, encefylitidy* spojené s horečkami a u malých dětí s výskytem vyrážky a skvrn na pokožce ve formě tzv. šesté nemoci. (Bednář, 1996)

5 VYBRANÍ MYKOTIČTÍ PŮVODCI RESPIRAČNÍCH INFEKCÍ

Jedná se o eukaryotické organismy, které vyvolávyjí v lidském organismu různé druhy infekcí. Buňky se liší od ostatních přítomností ergosterolu v cytoplazmatické membráně, čehož je využíváno při aplikaci antimykotik, které inhibují právě syntézu ergosterolu. Tímto mechanismem je zajištěn dostatečný efekt léčiva a i jeho selektivita působit cíleně na buňky hub. Stěna hub obsahuje take chitin. (Votava, 2010)

Další z odlišností se týká jejich způsobu rozmnožování. Jsou totiž schopné rozmnožovat se jak pohlavním způsobem (obdoba meiotického dělení), tak nepohlavím způsobem (pučením, oddělováním mycelia, tvorbou zárodků a jejich mitotickým dělením) . Existují dvě základní morfolgické jednotky mikromycet. Jsou to kvasinky a hyfy, neboli vlákna. Kvasinka je kulatá nebo oválná buňka rozmnožující se hlavně pučením a hyfa je mnohobuněčný vláknití útvar s tendencí tvorby mycelia. (Votava, 2010) Taxonomické zařazení hub je velice nesnadné a proto se v lékařské mykologii využívá spíše jejich rozřazení na základě jejich patogenního působení. (Schindler, 2010)

Laboratorní diagnostika původců mykologických onemocnění je velice obdobná bakteriologické diagnostice. Součástí vyšetření bývá kultivace na speciálních kultivačních půdách a mikroskopické pozorování s následnou identifikací. Odebraným materiálem bývají vlasy, nehty, kožní šupiny nebo stěry u podezření na slizniční mykózy nebo výtěry z ran. Při podezření na systémovou mykózu jsou prováděny i odběry biologických materiálů, jako krev, moč, sputum nebo likvor. (Votava, 2010)

5.1 Rod Candida

Rod *Candida* je jedním z nejrozšířenějších a nejčasteji nalézaných mykologických zástupců v klinickém materiálu. Tyto kvasinky jsou původci onemocnění souhrně označovaných jako kandidózy. Významnými zástupci jsou *Candida albicans* a ostatní candidy nazývané jako *Candida nonalbicans*. Těmi jsou například *Candida tropicalis a Candida parapsilosis.*

5.1.1 **Candida albicans**

Charakteristické znaky: typický oportunní patogen. Je schopna infikovat velmi rozmanité části lidského těla a orgánové soustavy. Tato vlastnost je dána vysokým faktorem virulence, který vychází ze schopností *C. alibcans* přecházet mezi morfologickou jednotkou kvasinky a hyfami. Dále také jejich schopností tvořit biofilm, nebo jejich rychlému přizpůsobení se kolísajícímu pH a produkcí adhezinů. Kolísající pH má za následek právě variabilitu v morfologických jednotkách. Při vysokém pH je indukována tvorba hyf a při naopak nízkém pH dochází k tvorbě převážně kvasinek. (Mayer, 2013) U zdravého člověka je *C. albicans* přítomna v ústní dutině a stolici. Diagnostika plicní kandidózy je velmi obtížná, protože se nevyznačuje typickými symptomy onemocnění.

Laboratorní diagnostika: diagnostika plicní kandidózy opírá především o kultivační a mikroskopickou metodu. (Zazula, 2005)

Kultivace: kultivačním médiem je Sabouraudův agar. Kolonie jsou hladké, smetanově bílé barvy a mazlavé konzistence. Kandidy nejsou náročné na kultivaci. Při 37°C se kultivují obvykle jeden až dva dny. (Bednář, 1996)

Patogenita: Plicní kandidóza postihuje většinou neutropenické pacienty. Vídáme ji nejčastěji u kojenců nebo imunosuprimovaných. Onemocnění, které přispívají k rozvoii plicní kandidózy mohou být například malignity, nebo diabetes mellitus. (Bednář, 1996)

Jednou z méně závažných kandidóz je kožní kandidóza. Objevuje se jako bílý povlak, moučnivka na místech, kde dochází k vlhké zapářce. Kožní kandidózy se často léči lokálním potíráním krystalovou violetí. Dalšími formami kandidóz, může být vulvovaginitida nebo systémové kandidózy, které bývají velmi závažné a mohou končit i letálně. (Schindler, 2010)

5.2 Rod Aspergillus

Vláknité houby typicky se vyskytující u imunosuprimovaných, pacientů po transplantaci, pacientů léčených kortikosteroidy nebo leukemičtí pacienti. Vyvolávají onemocnění zvané aspergilózy. Stejně jako kandidy se i aspergilly chovají jako typické oportunní patogeny.

Existuje mnoho druhů aspergilů a známých jich je kolem dvou set. Mikroskopickou diagnostikou je možné pozorovat jednotlivé hyfy zakončené měchýřkovitým útvarem. (Votava, 2010)

5.2.1 Skupina Aspergillus fumigatis, Aspergillus flavus, Aspergillus niger

Charakteristické znaky: zástupci rodu *Aspergillus* se v přírodě nacházejí převážně v půdě, na rozkládající se organické hmotě, nebo na částečkách prachu. Vstupní branou infekce do těla je tedy dýchací nebo trávicí trakt. (Votava, 2010)

Laboratorní diagnostika: využívá mikroskopického průkazu fragmentů mycelia, kultivaci aspergillů z odebraného BALu, sputa nebo ostatního materiálu. Možný je také průkazu antigenu, nebo protilátek metodou ELISA.

Kultivace: Aspergilly nejsou náročné na kultivaci. Doba kultivace je přibližně 48-96 hodin a vykultivované kolonie mají podobu zabarveného chmíří. (Bednář, 1996)

Patogenita: postižení dýchacích cest má tři základní formy. Jedná se o alergickou reakci, plicní aspergilon nebo invazivní plicní aspergilózu. Plicní aspergilon může vznikat například po prodělání plicní tuberkulózy, napadá bronchiální strom. Invazivní plicní aspergilóza je nejzávažnějším projevem aspergilóz. Plíseň postupně prorůstá tkání plicního parenchymu dále do cév s následným výskytem nekróz a respirační insuficiencií. Onemocnění oslabuje čistící funkci plic a současně potlačuje kašlací reflex. (Zazula, 2005)

Rod *Aspergillus* je take významným producentem mykotoxinů poškozující ledviny a játra. Nejznámnější je aflatoxin, který se může koncentrovat v substrátech kontaminovaných aspergily – arašídy, pistácie i sušené plody. (Votava, 2010)

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

6.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem mé bakalářské práce je popsat problematiku respiračních infekcí a možnosti laboratorní diagnostiky jejich původců používaných v klinické praxi.

6.2 Dílčí cíle

1. Popsat a zařadit vybrané reprezentativní původce respiračních infekcí.
2. Popis konkrétních laboratorních metod využívanýchk identifikaci původců respiračních infekcí.
3. Seznámit se a zvládnout laboratorní diagnostiku těchto infekcí.
4. Analýza a a popis laboratorních výsledků získaných v laboratořích FN Plzeň za období od října 2018 do září 2019 a jejich porovnání s ostatními kraji v ČR dle statistik SZÚ v Praze.

7 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

1. Předpokládám, že respirační infekce vykazují sezónní charakter

8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Analyzované vzorky pochází od pacientů, u nichž bylo vysloveno podezření na možnou respirační infekci. Materiál byl odeslán na vyšetření do laboratoře Virologie, sérologie a parazitologie FN Plzeň k potvrzení nebo vyloučení tohoto podezření. Vzorky pocházejí od pacientů FN v Plzni, ale i od pacientů z širšího spádového území vzhledem k jedinečnosti virologické laboratoře v Plzeňském regionu. Výsledky mi byly posktnuty se souhlasem útvaru náměstkyně pro ošetřovatelskou péči Fakultní nemocnice Plzeň.

9 METODIKA PRÁCE

9.1 Oběr materiálu

Odběr jednotlivých druhů materiálu má laboratoř precizně a srozumitelně definovaný v Laboratorní příručce. Pro úplnost jsou uvedeny nároky laboratoří Mikrobiologického ústavu FN Plzeň na odběr veškerého materiálu při požadavku na detekci možného původce nějaké respirační infekce. Podrobně je zpracována detekce možných virových původců těchto onemocnění.

- Bakteriologie a mykobakteriologie

Tabulka č.1 Typy odběrových materiálů pro bakteriologické a mykobakteriologické oddělení

Typy odběrových materiálů pro bakteriologické a mykobakteriologické oddělení			
Typ odebraného materiálu	**Specifikace materiálu**	**Přidané látky**	**Objem**
tampon T	sterilní tampon na tyčince v transportní zkumavce	-	-
tampon D	sterilní tampon na drátu v transportní zkumavce	-	-
tampon T-TM	sterilní tampon na tyčince v transporntní zkumavce	transportní médium dle Amiese nebo Stuarta	-
tampon D-TM	sterilní tampon na drátu v transporntní zkumavce	transportní médium dle Amiese nebo Stuarta	-
tampon T2	dvojitý sterilní tampon na tyčince	transporntní médium dle Stuarta	-
kontejner S	sterilní kontejner z průhledného plastu se šroubovacím uzávěrem	-	objem kontejneru 30 ml
kontejner M	sterilní kontejner z průhledného plastu se šroubovacím uzávěrem	-	objem kontejneru 50 ml
Petriho miska S	sterilní skleněná Petriho miska zabezpečená lepicí páskou	-	-
zkumavka	sterilní zkumavka z průhledného plastu s uzávěrem	-	objem zkumavky 10 ml

anaerobní systém	jednorázová sterilní injekční stříkačka uzávěrná Combi zátkou	-	objem stříkačky 5 ml
Hemo Bactec AE	hemokultivační lahvička BD BACTEC PLUS aerobic/ F	-	-
Hemo Bctec ANA	hemokultivační lahvička BD BACTEC Lytic 10 Anaerobic/F	-	-
Hemo Bactec PED	hemokultivační lahvička BD BACTEC PEDS PLUS/F	-	-
Hemo Bactec Myco	hemokultivační lahvička BD BACTEC Mycosis IC/F	-	-
OS QF TB	odběrová souprava pro stanovení interferonu gama v krvi pro detekci infekce *Mycobacterium Tuberculosis*	-	-
OS PK	odběrová souprava pro současný odběr n PCR a kultivaci tenkým tamponem	-	-

Zdroj: Laboratorní příručka Ústavu mikrobiologie

- Virologie

Před samotným odběrem materiálu na virologické vyšetření je důležité rozhodnout, kdy a jaký materiál odebrat. Na náběr k izolaci viru je ideální doba odběru do 4-5 dnů od začátku onemocnění. Na průkaz protilátek je vhodná doba odběru 10 dnů od začátku onemocnění. Ten musí být na žádance uveden. Sledujeme-li u některých metod dynymiku tvorby protilátek, je vyžádán druhý odběr minimálně 10 dnů po prvním.

Tabulka č.2 Typy odběrových materiálů pro virologické oddělení

Typy odběrových materiálů pro virologické oddělení			
Typ odebraného materiálu	**Specifikace materiálu**	**Přidané látky**	**Objem**
zkumavka S	sterilní zkumavka k odběru srážlivé krve	-	-
zkumavka Nedta	sterilní zkumavka pro odběr nesrážlivé krve	K3EDTA	-
zkumavka	sterilní zkumavka z průhledného plastu s uzávěrem	-	objem zkumavky 10 ml
tampon S	dvojitý sterilní tampon na tyčince	transportní médium dle Stuarta	-

OS VIR	odběrová souprava pro kultivaci virů na tkáňové kultuře a jiný průkaz antigenu (uchovávat zmražené)	obsah transportního média ve sterilní zkumavce a štětečku	objem kontejneru 30 ml
OS QF CMV	odběrová souprava pro stanovení Interferonu gama v krvi pro detekci infekce CMV	-	objem kontejneru 50 ml

Zdroj: Laboratorní příručka Ústavu Mikrobiologie

9.2 Shrnutí prováděných testů na průkaz virových agens zahrnutých do respiračního panelu laboratoře ve FN Plzeň

Tabulka č.3 Souhrnné zhodnocení prováděných testů respiračního panelu oddělní Virologie FN Plzeň

Souhrnné zhodnocení prováděných testů respiračního panelu oddělní Virologie FN Plzeň					
	ELISA	Kultivace	PCR	KFR	HIT
Influenza A virus		+	+	+	+
Influenza B virus		+		+	+
Adenovirus	+	+		+	
RS- virus	+	+		+	
Mycoplasma pnemoniae	+			+	
Chlamydia psit., trach., pn.	+				
Cytomegalovirus			+		
Herpes simplex virus		+	+		
Parainfluenza virus 1, 2, 3, 4	+	+			+
HHV 6			+		

Zdroj: Interní materiály Oddělení virologie FN Plzeň

9.3 Detekce protilátek metodou ELISA proti virovým a bakteriálním agens obsažených v respiračním panelu

Metoda ELISA je jedna ze skupiny nepřímých stanovení, prokazujeme tedy nepřímo přítomnost viru v těle měřením hladiny protilátek a jejich dynamikou. Obecně je nejčastějším odbebíraným materiálem srážlivá krev. Odběrovou soupravou je zkumavka Vacuette bez protisrážlivého prostředku, často označena červeným víčkem nebo sterilní zkumavka z umělé hmoty. Odebíraný objem krve jsou 4 ml venózní krve. Samotný odběr podléhá SNL/DOS/SOP039 O odběru žilní krve, který stanovuje podmínky odběru a připravu pacienta.

Využití: Adenovirus, RS-virus, *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia psittaci, Ch. trachomatis* a *Ch. pneumoniae*

Princip testu spočívá v detekci přítomnosti IgG a IgM protilátek v odebraném séru pacienta. Test probíhá v mikrotitračních destičkách, kde na spodní části jamek je na pevné fázi navázán specifický antigen. Protilátka se naváže na antigen v pevné fázi na dně jamky a utvoří komplex Ag-Ab. K detekci vzniklého komplexu je do reakce přidána značená zvířecí protilátka, jde o imunoglobulinovou frakci s navázanou značkou, nejčastěji křenovou peroxidázou. Po inkubaci je do reakce přidán substrát s TMB, který zabarví mikrotitrační destičku na modro pokud je test pozitivní. Celý tento proces je ukončen zastavovacím roztokem, který změní modrou barvu na žlutou. Intenzitu zabarvení odečítáme na fotometru při vlnové délce 450 nm.

Použité reagencie

Pracovní roztoky jsou dodávány v komerčních kitech od výrobce z důvodů zaručení kvalitních výsledků testu.

- pufr na ředění sér
- kontrolní roztoky a kalibrátory jsou již naředěné od výrobce
- kojugát je také již naředění jako součást kitu
- chromogen (substrát)
- zastavovací roztok
- promývací roztok, který se desetkrát ředí deionizovanou vodou
- Vzorky séra ředíme 1:101 (10 ul pacientského vzorku a 1 ml puftu)

Pracovní postup

Všechny reagencie je nutné před začátkem reakce vytemperovat na laboratorní teplotu, a pokud nepoužíváme celou mikrotitrační destičku vrátíme zbylé stripy do obalu se suši-

dlem. Následně probíhá pipetování naředěných reagencií do jamek destičky. První jamka A1 je určena pro negativní kontrolu, jamka B1 pro pozitivní kontrolu. Třetí jamka C1 je určena pro aplikaci kalibrátoru. Od jamky D1 jsou pipetovány pacientské vzorky dle stanoveného ředění. Po napipetování reagencií se destička 30 minut inkubuje při pokojové teplotě uzavřena víčkem. Obsah jamek je následně třikrát promyt 450 µl promývacího roztoku s intervaly 30 vteřin a znovu naplněn 100 µl konjugátu (jamka číslo 1 zůstává prázdná). Destičku opět inkubujeme 30 minut přikrytou víčkem při pokojové teplotě. Po inkubaci opět promýváme stejným způsobem jako prvně a do všech jamek dávkujeme 100 µl chromogenního substrátu a inkubujeme 15 v temném prostředí. Posledním krokem reakce je přidání 100 µl zastavovacího roztoku. Odečet hodnot provádíme na fotometru při vlnové délce 450 nm a referenčním filtru 630 nm. V současné době je tento proces z větší části automatizován a tím je docíleno větší rychlosti vydávání výsledků.

Zhodnocení výsledků

Hodnocení testu je semikvantitativní a vychází z podílu hodnot extinkce kontrol nebo vzorků s extinkcí kalibrátoru číslo 2

- Pozitivní výsledek je od hodnoty podílu větší ne 1,1
- Negativní výsledek je ten, jehož hodnoty jsou nižší než 0,8
- Oblast mezi hodnotami negativního a pozitivního testu je nazývána hraniční oblastí

Pro každý konkrétní test existují přesné hodnoty při kterých je výsledek označen za platný. Tyto hodnoty se u jednotlivých testů liší a jsou definovány v příbalových letácích jednotlivých šarží.

Zdroj: Interní materiály Oddělení virologie FN Plzeň

9.4 Průkaz virů respiračního panelu diagnostikované pomocí izolačních metod

Kultivační metoda je založená na přímém vykultivování viru na předem připravených kultivačních médiích. Samotná kultivace a možný cytopatický efekt je doplněna o mikroskopii, která usnadňuje prohlížení kultur a umožňuje pořizovat fotografické snímky. Nevýhodou vyšetření je hlavně jeho časová náročnost

Využití: Influenzavirus typu A, influenzavirus typu B, RSV virus, HSV virus, adenovirus, parainfluenzavirus

Kultivace virů se provádí nejčastěji na buněčných kulturách. Viry není možné kultivovat na běžných mikrobiologických médiích z důvodu potřeby živých buněk k reprodukci virů.

Druhy buněčných kultur použité v klinicé praxi

- LMP – jsou buňky z lidských embrionálních plic získaných pomoci trypsinace. Buňky mohou být získávány z lidských plodů při interrubci zdravých žen. Výsledkem jsou fibroblastoidní diploidní buňky smísené s médiem v přesně daném poměru Jejich sada chromozomů je zachována (2n) a taktéž i jejich pořadí. Obnovení (pasážování) je tím pádem omezeno a vydží zhruba 50 obnovení, pak následuje jejich zánik. Ideální je používat buňky do 32 obnovení, protože pak nastává jejich degenerace. Kultivační teplota je 37 °C . Buňky jsou dostatečně citlivé k HSV, Adenovirům, RSV a Cytomegaloviru.
- VERO – pochází z ledvin kočkodana zeleného. Tato velmi stabilní buněčná linie se nejčastěji používá ke kultivaci RSV. Jejich soubor chromozomů je pozměněn a obsahují tak pouze haploidní sadu. Jejich pasážování je neomezené, ale buňky časem postupně degenerují.
- MDCK – jedná se o buňky izolované z ledvin kokršpaněla nejčastěji využívané k izolaci viru chřipky, adenovirů a HSV. Mají taktéž pouze haploidní sadu chromozoů a je možné je neomezeně dělit s rizikem postupné degenerace.

Při práci s buňkami LMP a VERO využíváme při nasazování kombinace trypsinu nebo trypsin-verzenu s PBS pufrem a u MDCK buněk využíváme pouze kombinaci trypsin-verzenu. Dle druhu buněk se narostlá tkáňová kultura promývá PBS pufrem nebo opět kombinací trypsin-verzenu. Kultivace probíhá v umělohmotných nádobkách. Celá plocha nádobky se dvakrát omyje trypsinem a nadbytek se slije. Nádoba obsahující zbytek trypsinu se vkládá do termostatu. Kontroluje se každých 5 minut a nádobkou se lehce zatřese. Až dojde k nárůstu buněk do takové úrovně že se při potřepání uvolní celý buněčný list přidáváme do lahvičky zhruba 7 µl růstového média. Buňky rozvolníme a jejich množství počítáme buď v Bürkerově komůrce, nebo zkušeným odhadem. Při kultivaci dochází k výměně média po nárůstu monovrstvy buněk. Odsaje se růstové médium a přidá se udržovací médium. Připravené buněčné kultury jsou následně infikované. Materiálem kterým infikujeme medium jsou nosní s krční výtěry.

V případě použití MDCK buněk využíváme 2-3 zkumavky v případě využití ostatních buněčných kultur jen 2.

V případě kultivace viru chřipky na MDCK buněčných kulturách odpipetujeme 0,1 ml materiálu do zkumavek vypláchnutých PBS pufrem. Inkubujeme 20 minut při pokojové teplotě ve vodorovné poloze. Do reakce se přidává ještě 1,1 ml chřipkového média. Následuje inkubace v termostatu při 34 °C. Druhá pasáž se provádí odpipetováním 0,2 ml z

první pasáže a přidáním 1 ml chřipkového média. Při kultivaci na LMP a VERO buňkách pipetujeme 0,5 ml materiálu do jedné zkumavky.

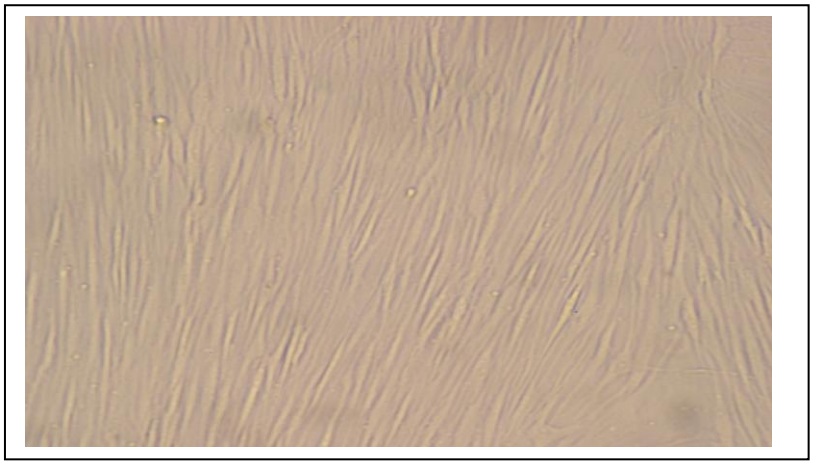
Posledním krokem je identifikace viru. Ta probíhá na základě sledování cytopatogenního efektu viru na tkáních například pomoci fluorescenčního obravení, metodou PCR nebo chromatograficky.

Nejčastějším izolovaným respiračním virem je virus chřipky. Jeho kultivace probíhá na MDCK buňkách. Pasážování probíhá jednou týdně, většinou v pátek. Používá se 0,2% roztok trypsinu-verzenu. Ihned po příjmu materiálu jsou předem připravené buněčné kultury infikovány. Infikovány jsou 2-3 zkumavky 0,1 ml materiálu. Materiál nechámě 20 minut inkubovat při pokojové teplotě. Po proběhlé inkubaci přidáme 1,2 ml chřipkového média a inkubujeme při 34 °C. V případě, že buňky jsou v dobrém stavu není nutné provádět pasážování. Pokud ne, provádí se obvykle 2-3 pasáže aby byla dodžena doba kultivace na 10 dnů.

Kultivace adenovirů probíhá na LMP buňkách, infikování probíhá do dvou zkumavek přidáním 1 ml udržovacího media, 0,2 - 0,5 ml vzorku. Mezi pasážemi vzorek projde mrazem při teplotě -70°C. Při pokojové teplotě rozmrzne a slije se. Během kultivace se provádí 2-3 pasáže a celková doba kultivace dosahuje 28-30 dní. Identifikace adenovirů probíhá imunofluorescenčním barvením preparátu, nebo pomocí KFR, kdy se izolovaný virus připraví jako antigen.

(Interní materiály Virologie FN Plzeň)

Obrázek č.1 LMP ukázka buněčné kultury



Zdroj: Interní material Oddělei Virologie FN Bory

9.5 Průkaz virů respiračního panelu pomocí metody PCR

Metoda využívaná především pro kvalitativní stanovení virových patogenů. Konkrétně ve FN Plzeň se provádí vyšetření PCR jako multiplexové stanovení v takzvaných triplexech

nebo quadruplexech. Příprava vzorků je důležitou fází pro správné provedení PCR. Izolace genetické informace probíhá v podobě DNA nebo cDNA. cDNA je forma RNA po úpravě reverzní transktiptázou. Kromě správné izolace DNA je důležité i zamezení jakékoliv kontaminace cizí DNA. Pro pipetování požadovaných objemů se používají pipetovací špičky s filtrem.

Využití metody PCR ve virologii nachází uplatnění hlavně při detekci těžko kultivovatených agens. Dalším důvodem je také rychlost stanovení oproti jiným metodám.

Využití: Influenzavirus typu A, cytomegalovirus, herpes simplex virus, HHV 6

Použité reagencie pro izolaci: vzorek, pozitivní a negativní kontrola, pufr a voda pro provedení PCR v bile zkumavce

Použité reagencie pro amplifikační reakci: primery (oligonukleotidy dlouhé zhruba 20-25 bází) termostabilní DNA polymeráza, dostatek deoxynukleotidů, matricové vlákno DNA

Provedení izolace: samotné reakci předchází přesně provedená izolace vyšetřované genetické informace. Ta se provádí do modré zkumavky z izolační soupravy. Mísí se 10 µl RNA a 200 µl vzorku. Při běžných stanoveních není nutné provádět kontroly, ale v případě jejich nutnosti značíme zkumavky K+ (pozitivní) a K – (negativní). K+ zkumavka je červená a kontrolní roztok rozpouštíme ve 100 ul sterilní vody pro injekci. Roztok následně zamrázíme. Negativní kontrola je ve žluté zkumavce předem připravena.

Postup: do předem připravených stripů napipetujeme 15 µl pufru a přidáme 5 µl izolovaného vzorku nebo kontrol. Stripy uzavřeme a necháme stočit na centrifuze. Stočené vzorky přenášíme do smart zkumavek a vkládáme do cycleru.

Principem metody je několikanásobné opakování tří základních reakcí v jedné zkumavce a vytvořerná vlákna jsou matricemi pro další cyklus reakce. Celá reakce probíhá v termocykleru, který zabezpečuje správnou teplotu pro každou fázi amplifikace a jejich rychlé a přesné přechody. Ke zviditelnění reakce je možno využít obarvení etidiumbromidem nebo DNA sondou.

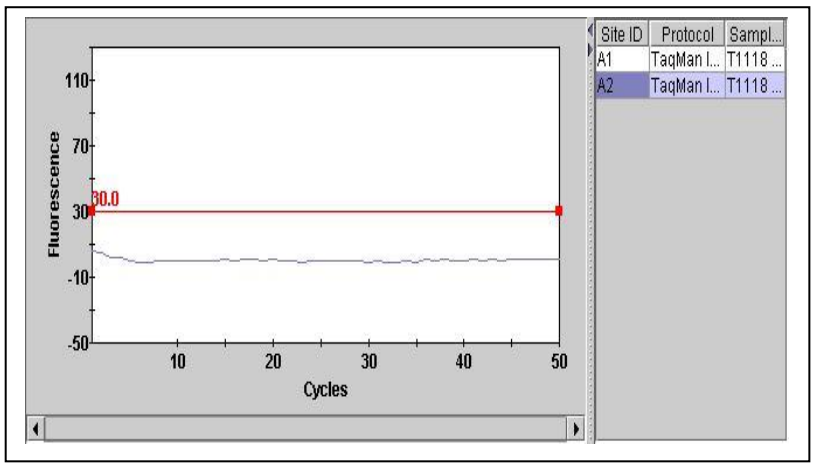
Těmi třemi reakcemi jsou:

- Zahřátí dvoušroubovice na tak vysokou teplotu, že dojde k jejímu rozpletení na samostatná vlákna (94-98°C)
- Za současného ochlazení dochází k napojení přidaných primerů a vytvoření tak ohraničeného úseku určeného k amplifikaci (50-60°C)

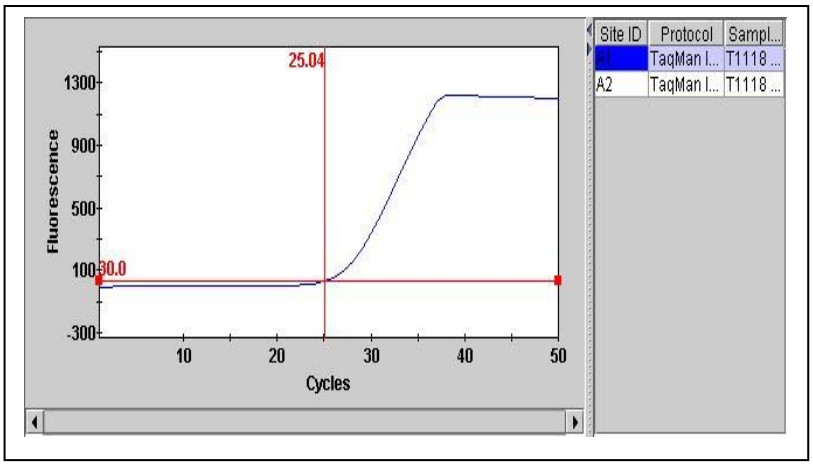
- V přítomnosti termostabilní polymerázy a nadbytku jednotlivých deoxyribonukleotidtrifosfátů dojde k syntéze kopie hledaného úseku DNA (72-80°C)

Proběhlá amplifikace genetické informace je značena fluorescenční barvičkou a zaznamenáván je každý cyklus. Záznam amplifikace umožňují fluorescenční sondy, které se na jednotlivé úseky navazují specificky nebo nespecificky. Grafickým zpracováním výsledku RT-PCR může být sestavení standardní křivky z naměřených intenzit fluorescence.

Obrázek č. 2 Negativní výsledek PCR reakce



Obrázek č.3 Pozitivní výsledek PCR reakce



Zdroj: Interní materiály Oddělení Virologie FN Bory

9.6 Detekce protilátek metodou KFR proti virovým agens a bakterii Mycoplasma pneumoniae

Komplement fixační reakce je další nepřímou metodou využívanou v klinické praxi pro stanovení respiračních virů. Nejčastějším odbebíraným materiálem je srážlivá krev. Odběrovou soupravou je zkumavka Vacuette bez protisrážlivého prostředku.

Využití: influenzavirus typu A, influenzavirus typu B, adenovirus, RS virus, *Mycoplasma pneumoniae*

Princip reakce: je založen na průkazu proti specifickým Ag virů chřipky v jednotlivých sérech pomocí vazby komplementu. Důkaz o akutní infekci je nejméně čtyřnásobný vzestup titru protilátek ve vyšetřených párových sérech. Protilátka se spojí se specifickým Ag za vzniku komplexu. Na vzniklý komplex se naváže komplement a tím přichází o svou schopnost lyzovat červené krviny. Červené krvinky jsou do reakce přidávány ke zviditelnění reakce, konkrétně se jedná o beraní krvinky s přídavkem hemolyzinu. Pokud tedy nedojde ke zhemolyzování beraních krvinek, dojde k jejich usazení na dně mikrotitrační destičky – reakce je pozitivní. Jednotlivé destičky jsou před použitím vymrazené a i jednotlivé reagencie jsou temperované na velmi nízkou teplotu.

Reagencie pro KFR jsou dodávány výrobcem v jednotlivých baleních, které na štítcích obsahují i přesné pokyny o jejich ředění.

Postup: po přípravě všech potřebných reagencií je dalším krokem pracovní ředění Ag. Ten se ředí v poměru 1:16 Veronalovým pufrem a uchovává se při teplotě 2-10 °C přičemž trvanlivost naředěného pufru je 24 hodin. Dalšími materiály reakce jsou 2 jednotky komplementu, hemolytický systém (složený ze 2% beraních erytrocytů a 2-3 jednotek hemolyzinu), vyšetřovaný vzorek séra , který je inaktivovaný teplotou 56°C po dobu 30 minut a ředěný v poměru obvykle od 1:8 do 1:256. Komplement, který je použit v reakci je morčecí komplement uchovávaný při teplotě 4°C, nebo v jeho naředěné formě zamražený. U nových šarží komplementu provádíme titraci komplementu vychlazeným pufrem. Výsledkem této titrace je pak rozředěný komplement v pomocných zkumavkách.

Tabulka č. 4 Ředění komplementu

Výsledné ředění 1:	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Komplement (ul)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Pufr (ul)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200

Zdroj: Interní materiály Oddělení virologie FN Plzeň

Na mikrotitrační destiččce si označíme řady A-D . Řady A a B jsou navzájem paralelní a obsahují rozpipetovanou řadu komplementu 1:10 – 1:120, 25 µl pufru a 25 µl Ag v pracovní ředění. Řada C na destiččce je kontrolní řada obsahující komplement bez přítomnosti Ag., pipetujeme 50µl pufru a 25 µl komplementu. Řada D slouží pro kontrolu hemolytického systému, nenachází se v nich ani Ag ani komplement jen 75 µl pufru.

Destička se po rozpipetování uzavře víčkem a inkubuje v lednicic od 2-10 °C přes noc. Druhý den se do reakce přidává ředěný hemolytický systém dle pokynů výrobce. Příklad ředění, 2 jednotky = (1/2 x titr hemolyinu) :100

Destička se po inkubaci vytemperuje na 37 °C a do všech použitých jamek se napipetuje 50 ul hemolytického systému. Obsah se promíchá a po 30 minutové inkubaci v termostatu se destička nechá odstát a odečítá se pomocí zrcátka.

Hodnocení se provádí běžně užívanou symbolikou.

Tabulka č. 5 Hodnocení KFR dle používané symboliky

Označení typu 1	Označení typu 2	Charakteristika
0	-	Úplná hemolýza bez sedimentu
1	+	Načervenalý roztok, asi 25% krvinek sedimentuje
2	++	Zhruba 50% krvinek tvoří sediment, narůžovělý roztok
3	+++	Zhruba 75% krvinek tvoří sediment, lehce naržovělý roztok
4	++++	100% krvinek sedimentuje, bezbarvý roztok

Zdroj: Interní materiály Oddělení virologie FN Plzeň

Pokud se v základním ředění označují séra jako 0 (-) jsou považována za negativní, pokud jsou ohodnocena + nebo ++ je označen za slabě pozitivní. Vzorky na +++ a ++++ jsou jasně pozitivní. Celkový výsledek je udáván v titrech.

9.7 Diagnostika virů respiračního panelu hemaglutinačně inhibičním testem

HIT je určený pouze po průkaz virů se schopností hemaglutinace. Při reakci dochází k vazbě protilátky ze séra na specifický Ag. Vznikem vazby Ag a protilátky dochází ke ztrátě schopnosti hemaglutinace následně přidaných krvinek.

Využití: influenzavirus typu A, influenzavirus typu B, parainfluenzavirus

Použitý materiál:

- ředící roztok 0,85% NaCl
- RDE, receptor ničící enzymy, cholera filtrát
- antigeny dodávané NRL

- akutní pacientské serum a rekonvalescentní pcientské serum, které díky RDE neobsahuje nespecifické inhibitory ani aglutininy (není třeba odstaňovat vždy). Ředění jednotlivých sér je obvykle od 1:8 do 1:256
- imunní sérum, pro pozitivní kontrolu
- 3x promísená suspense krvinek v pufru stočená na centrifuze o výsledné koncentraci 5%

Pro provedení HIT je třeba si nejprve vypočítat přesný objem potřebných specifických Ag pro jednotlivá onemocnění a krvinek. Do první a druhé jamky mikrotitrační destičky pipetujeme 25 µl pacientského séra v poměru 1:8. Od druhé jamky pipetujeme pufr. Pacientské sérum ředímě do jednotlivých jamek do poměru 1:256. Do všech jamek, kromě kontrolní řady, přidáváme 25 µl antigenu (pracovního ředění). Kontrolní řada místo antigenu obsahuje pufr. Reagencie necháme promíchat a inkubujeme 1 hodinu při teplotě odpovídající použitým Ag. Po inkubaci přidáváme 50 µl 0,5% koncentrace příslušných krvinek. V případě detekce virů chřipky A a B přidávámě krůtí krvinky. Následuje protřepání a konečná inkubace. Časy a teplota inkubací závisí na použitých krvinkách, které se navzájem liší. V případě virů chřipky A a B přobíhá inkubace 45 minut při pokojové teplotě.

Odečet výsledků probíhá porovnáním stékání neaglutinovaných krvinek. Srovnání provádíme s kontrolní řadou. Ta jamka, která jako poslední stéká po krajích jamky stejným způsobem je označena za konečný titr protilátek.

(Interní materiály FN Plzeň oddělení Virologie)

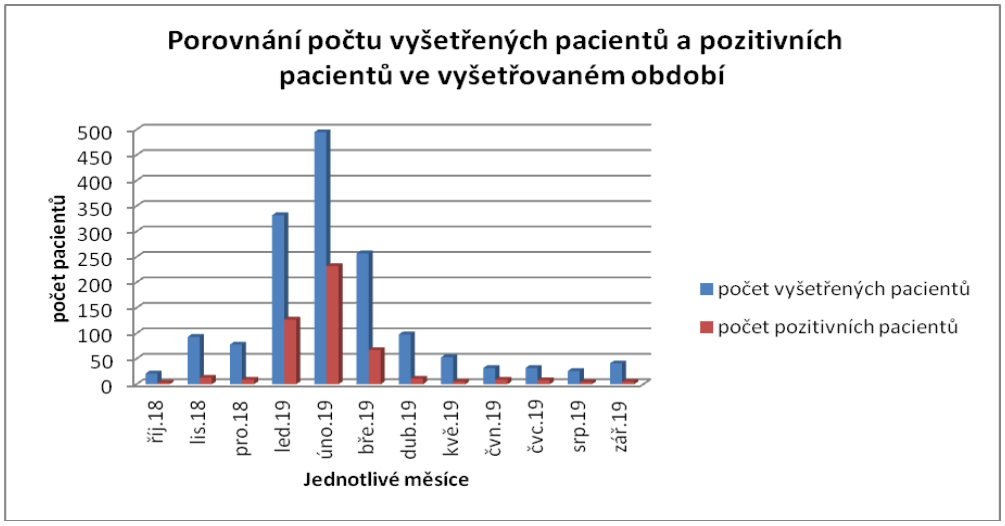
10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

V období od října 2018 do září 2019 bylo vyšetřeno na Oddělení virology, sérologie a parazitologie celkem 1 558 osob na průkaz respiračních onemocnění virových a některých bakteriálních onemocnění.

Tabulka č.6 Porovnání počtu vyšetřených a pozitivních pacientů za vyšetřované období říjen 2018- září 2019

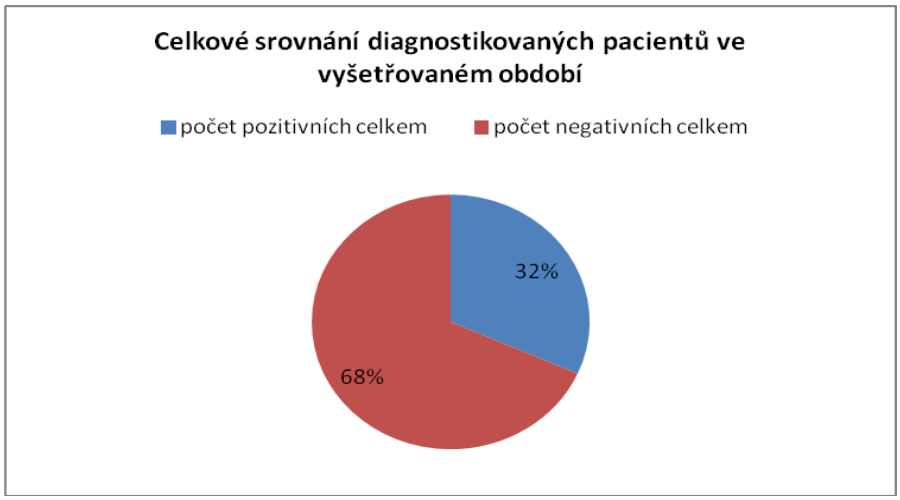
Porovnání počtu vyšetřených pacientů a pozitivních pacientů za období říjen 2018 - září 2019		
Měsíce	Počet vyšetřených pacientů	Počet pozitivních pacientů
říj.18	21	3
lis.18	93	13
pro.18	78	9
led.19	332	127
úno.19	495	232
bře.19	257	67
dub.19	98	11
kvě.19	53	5
čvn.19	32	9
čvc.19	32	8
srp.19	26	4
zář.19	41	5

Graf č. 1 Grafické znázornění celkovéhoí počtu vyšetřených pacientů a pozitivních pacientů za odbobí říjen 2018- září 2019



Graf názorně ukazuje patrný sezónní charakter virových respiračních infekcí.

Graf č. 2 Poměr celkově diagnostikovaných osob k počtu pozitivních ve vyšetřovaném období.



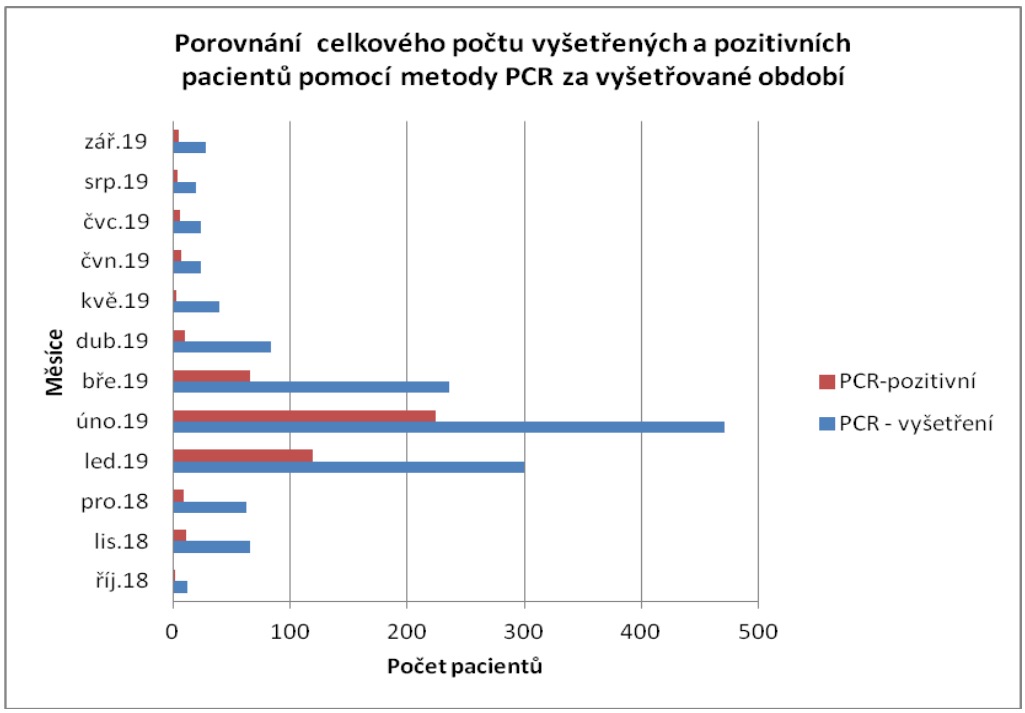
Poměr pozitivních a negativních testů vychází z celkového počtu 1558 pacientů. Pozitivních výsledků je tedy zhruba třetina.

V následující tabulce jsou uvedeny počty vyšetřených pacientů jednotlivými metodami a počty prokázaných pozitivních osob.

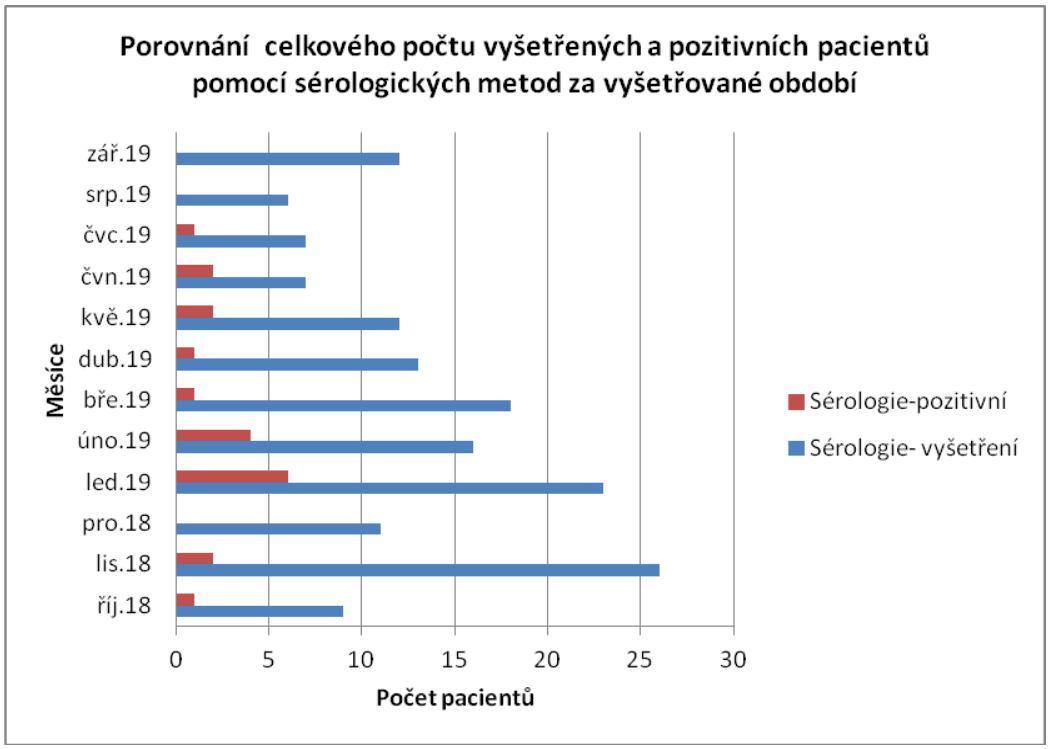
Tabulka č. 7 Porovnání způsobů analýzy a počtu pacientů za vyšetřované období

Porovnání způsobů analýzy a počtu pacientů za vyšetřované období						
Měsíce	PCR - vyšetření	PCR- pozitivní	Sérologie- vyšetření	Sérologie- pozitivní	Izolace- vyšetření	Izolace- pozitivní
říj.18	12	2	9	1	0	0
lis.18	66	11	26	2	0	0
pro.18	63	9	11	0	4	0
led.19	300	119	23	6	9	2
úno.19	471	224	16	4	8	4
bře.19	236	66	18	1	3	0
dub.19	84	10	13	1	1	0
kvě.19	40	3	12	2	1	0
čvn.19	24	7	7	2	1	0
čvc.19	24	6	7	1	1	1
srp.19	20	4	6	0	0	0
zář.19	28	5	12	0	1	0

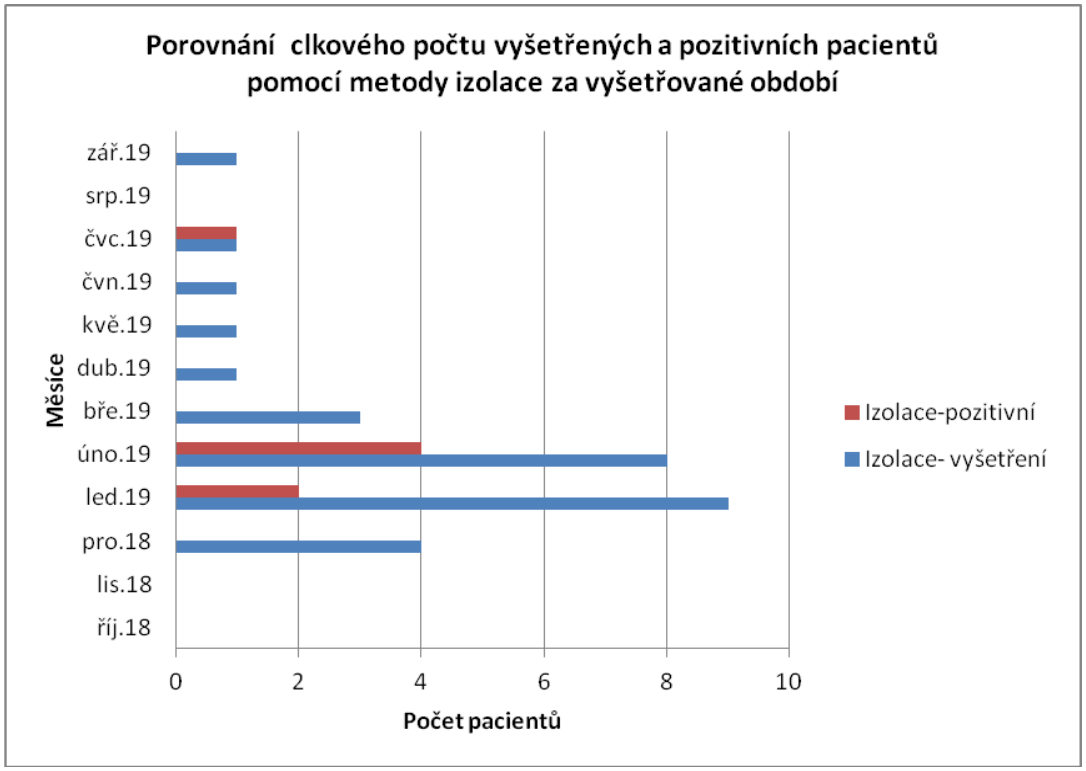
Graf č. 3 Porovnání počtu vyšetřených a pozitivních pacientů pomocí metody PCR za vyšetřované období



Graf č.4 Porovnání počtu vyšetřených a pozitivních pacientů. Pomocí sérologických metod za vyšetřované období



Graf č.5 Porovnání vyšetřených a pozitivních pacientů pomocí metody izolace za vyšetřované období



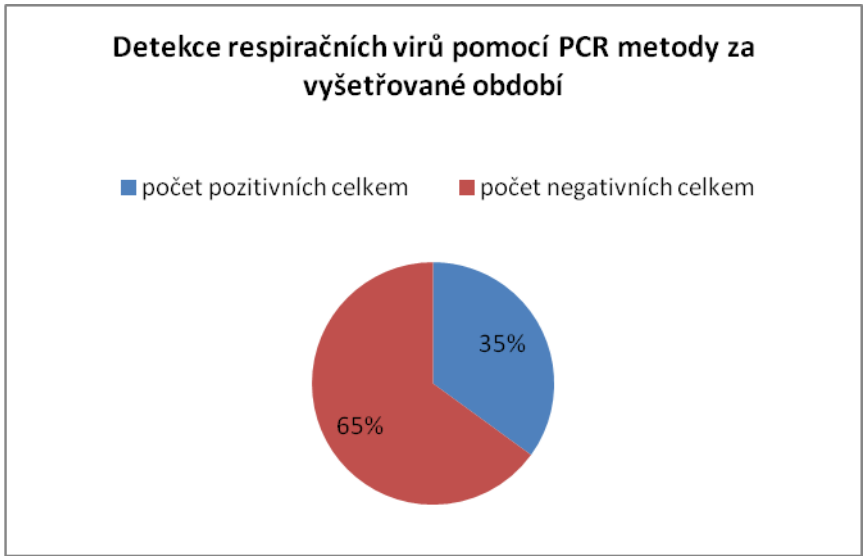
Výsledkem grafického zobrazení jednotlivých druhů vyšetření je nejenom viditelný sezeonní character, ale také jejich četnost. Počty provedených PCR se pohybují v řádech několika desítek až stovek, kdežto počet provedených izolací a sérologických metod jsou v oblasti jednotek až několika desítek stanovení.

Tabulka č. 8 Detekce virů pomoci metody PCR

Detekce virů pomoci metody PCR za vsšetřované období	
Typ viru	Počet pozitivních pacientů
A – chřipka typu A	298
AH1 – chřipka typu A (H1N1)	0
AH3 – chřipka typu A (H3N2)	0
B – chřipka typu B	0
HRSV - respirační syncitiální virus	130
HAdV - adenovirus	3
HPIV - *Parainfluenza*	2
HRV – rinovirus	32

CoV – běžné genotypy koronaviru	10
HMPV - metapneumovirus	4
počet vyšetření celkem	1368
počet pozitivních celkem	479

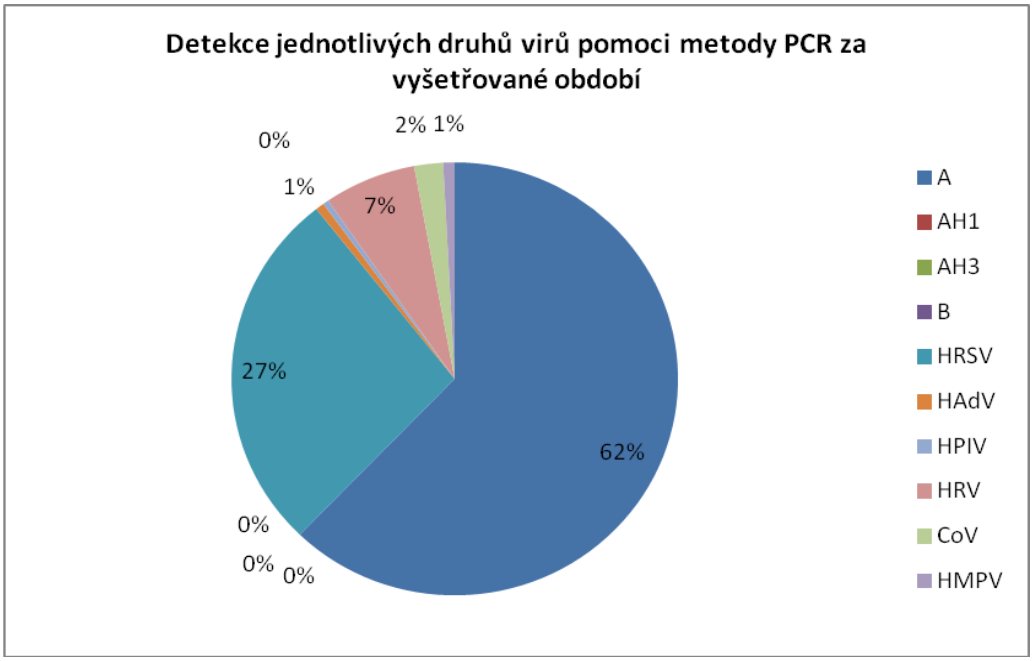
Graf č.6 Detkce respiračních virů pomocí PCR metody za vyšetřované období



Zdroj: Interní výsledky oddělení Virologie FN Plzeň

PCR je nejhojněji využívaná metoda při virologických stanoveních respiračních infekcí. Z výsečového grafu můžeme vyčíst, že zrhuba třetina z celkového počtu 1368 vyšetření bylo diagnostikováno jako pozitivní.

Graf č. 7 Detekce jednotlivých druhů virů pomocí metody PCR za vyšetřované období

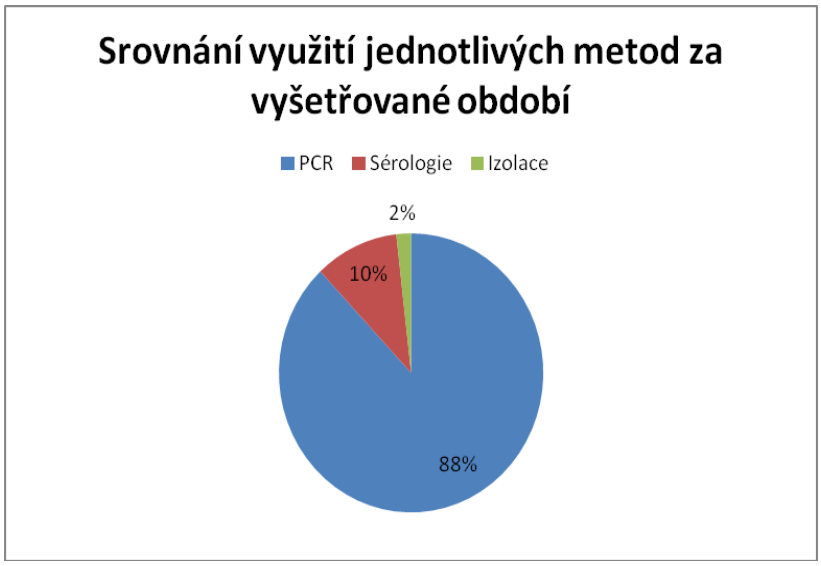


Z celkového počtu pozitivních vyšetření zaujímá chřipka typu A vice než polovinu. Druhým nejhojněji detekovaným virem je respirační syncitiální virus, který zabírá o něco méně než jednu třetinu. O zbylou část se dělí ostatní typy viru respiračního panelu.

Tabulka č. 9 Zhodnocení využití jednotlivých metod za vyštřované období

Zhodnocní využití jednotlivých metod za vyšteřované období		
Metoda	počet vyštření	počet pozitivních vyšetření
PCR	1368	466
Sérologie	160	20
Izolace	28	7

Graf č. 8 Zhodnocení využití jednotlivých druhů metod za vyštřované období



Z grafu je patrná převaha počtu provedených vyšetření pomoci RT-PCR nad ostatními sérologickými a kultivačními metodami. Je to dáno automatizací této metody, která umožňuje stanovení víc vzorků v kratších časových intrvalech.

Tabulka č. 10 Znázornění celkového počtu vyšetřených pacientů metodou PCR, sérologickými metodami a kultivací spolu s počtem pozitivních pacientů na konkrétní virus za vyšetřované období ve FN Plzeň

Znázornění celkového počtu vyšetřených pacientů metodou PCR, sérologickými metodami a kultivací spolu s počtem pozitivních pacientů na konkrétní virus za vyšetřované období ve FN Plzeň		
Diagnostikované agens	**počet vyšetřených pacientů**	**počet pozitivních pacientů**
PCR metoda	1368	-
Virus chřipky typu A		298
Virus chřipky typu A H1N1		0
Virus chřipky typu A H3N2		0
Virus chřipky typu B		0
Respirační syncitiální virus		130
Adenovirus		3
Virus parainfluenzy		2
Metapneumovirus		4
Koronavirus - běžné genotypy		10
Rhinovirus		32
Sérologické metody	160	-
Virus chřipky typu A		6
Virus chřipky typu A H1N1		0

Virus chřipky typu A H3N2		0
Virus chřipky typu B		0
Respirační syncitiální virus		4
Adenovirus		1
Virus parainfluenzy		0
Mycoplasma pneumoniae		9
Izolační metody	28	-
Virus chřipky typu A		6
Virus chřipky typu A H1N1		0
Virus chřipky typu A H3N2		0
Virus chřipky typu B		0
Respirační syncitiální virus		0
Virus parainfluenzy		1
Mycoplasma pneumoniae		0

Zdroj vlastní pro tabulky a grafy kapitoly 11

DISKUZE

V mé práci jsem se věnovala popisu jednotlivých respiračních infekcí spolu s jejich laboratorní diagnostikou užívanou v klinické praxi. V našem podnebném pásu patří respirační infekce k jedněm z nejčastějších infekcí naší populace a proto i k nejčastěji diagnostikovaným. Největší měrou se na jejich vzniku podílejí virová agens.

Již v úvodu jsem upozornila na to, že pohled na respirační infekce může být ze dvou odlišných směrů – z hlediska vstupu do organismu a nebo z hlediska klinických projevů. Představení a popis diagnostiky všech onemocnění, která vstupují do těla člověka respiračním traktem, by byl daleko obsáhlejší a byl by průřezem veškeré mikrobiologické laboratorní diagnostiky. Proto jsem se v obecném úvodu zmínila jen o některých vybraných zástupcích patogenních agens ze skupiny bakterií, virů a patogenních mykotických organismů, kteří nás respiračním traktem infikují a jejich laboratorní diagnostika je rozmanitá. Vzhledem k možnosti navštěvovat Oddělení virologie, sérologie a parazitologie se v praktické části se věnuji již jen laboratorní diagnostice virových agens a některých bakteriálních původců respiračních onemocnění, které rovněž svou diagnostikou spadají na virologické oddělení. Tyto bakteriální druhy se na pracovištích virologie diagnostikují již velmi dlouho, protože spolu s virovými původci mají podobné klinické příznaky. Většinou se jedná o obtížně kultivovatelné bakterie a tak se jejich přítomnost v organismu člověka prokazuje, podobně jako u virů, nepřímými diagnostickými metodami. V žádance o laboratorní vyšetření jsou automaticky uvedeny jako součást respiračního panelu diagnostikovaného na Oddělení virologie. Jedná se o bakterii *Mycoplasma pneumonia.* K její diagnostice je využíváno nepřímých metod, ELISA a KFR. Za vyšetřované období bylo těmito metodami diagnostikováno 7 pozitivních pacientů. Dalším bakteriálním zástupcem stanovovaným na virologickém oddělení jsou zástupci rodu *Chlamydia*. Při jejich stanovení se využívá metody ELISA. Ačkoliv tvoří významnou skupinu patogenních agens, výsledky testů se neodesílají Státnímu zdravotnímu ústavu a nejsou tak součástí statistického vyhodnocení respiračních infekcí který Státní zdravotní ústav každý měsíc sestavuje.

Za vyšetřované období (říjen 2018 – září 2019) bylo ve Fakultní nemocnici v Plzni na virologickém oddělení vyštřeno celkem 1558 pacientů, ze kterých byla zhruba třetina pacientů pozitivní.

Výsledky všech používaných metod jasně prokazují, že výskyt respiračních onemocnění vykazuje sezónní charakter s maximy výskytu od prosince do března. V ostatních obdobích

během roku je jejich výskyt mnohem menší, spíše ojedinělý, což dokazují některé doložené grafy. Ze všech sledovaných onemocnění tuto sezónnost vykazují všechna stejně a žádné z nich se v maximech výskytu během roku od ostatních neliší. Naše stanovená hypotéza tak byla potvrzena.

V našich podmínkách jsme každým rokem svědky výskytu chřipkové epidemie. Období jejího výskytu se může rok od roku měnit, ale vždy souvisí s průběhem v chladnějších měsících. Ostatní agens její výskyt kopírují. Záchyt chřipky by byl rozhodně vyšší, ale od všech naši občanů s podezřením na chřipku se materiál k laboratornímu průkazu nenabírá a většina případů výskytu se uzavírá na základě klinických příznaků. Dle očekávání a každoročního výskytu chřipkové epidemie tvoří zhruba 62 % všech pozitivních výsledků virus chřipky typu A. Druhým nejčastěji zachyceným agens je RS virus. Ostatní původci jsou spíše v minoritním zastoupení.

Výběr vhodné laboratorní metody je velmi důležitý pro získání validního výsledku. Výsledek vyšetření nám má podat co nejpřesnější aktuální dopad vztahu patogena, jeho hostitele a právě se projevující klinické příznaky. Laboratorní pracovník si nemůže volit metody individuálně, ale vždy vychází z nejnovějších vědeckých poznatků, doporučení odborných společností a samozřejmě osobních zkušeností. Nemalou roli při výběru hraje take ekonomická záležitost a dohody se zdravotními pojišťovnami. Při dodržení všech těchto kritérií musí být výsledek co nejpřesnější.

Mikrobiolog vždy preferuje metody přímého průkazu. Metody nepřímého průkazu jsou používány sice často, ale jen proto, že použití ostatních není z nějakých důvodů možné. Ve virologii se ještě nedávno používaly sérologické metody a kultivace na tkáňových kulturách ve větší míře. Sérologické metody ale mají svá interpretační omezení, diagnostika pomocí kultivace na tkáňových kulturách je zdlouhavá a pracná.

Obecně je možné říct, že na správném výsledku se tedy podílí přímý i nepřímý průkaz stejnou měrou i přes fakt, že sérologické metody tvoří v současnosti jen zhruba 10 % vyšetření.

Již mnoho let obě výše jmenované metody nahrazují molekulárně biologické metody. Jejich počáteční finanční náročnost již není tak vysoká a jsou stále častěji zařazovány do rutinní diagnostiky. Počet provedených PCR se pohybuje v řádu několika stovek vyšetření z nichž pozitivních je opět zhruba jedna třetina pacientů. Cifra počtu provedených kultivací a sérologických vyšetření je mnohem nižší, jedná se o několik desítek provedení za rok, z čehož v některých měsících nebyla izolace provedna vůbec, nebo nepřinesla žádný pozitivní výsledek, jak je patrné z grafu číslo 4 a 5. Jak ukazuje graf číslo 8, tvoří podíl

PCR na všech vyšetřeních provedených na virologii 88 %. Následují sérologická vyšetření (10 %) a pouze dvě procenta tvoří diagnostika pomocí izolace agens na tkáňových kulturách. Z toho se odvíjí i záchyt jednotlivých druhů virů touto metodou. Detekovaná agens jsou uvedena v gravu číslo 7. V budoucnu pravděpodobně tyto metody plně nahradí všechny ostatní a hlavně budou cenově snadno dostupné.

ZÁVĚR

Má práce se týká laboratorní diagnostiky respiračních infekcí se zaměřením na virové agens. Virologické oddělní ve Fakultní nemocnici v Plzni diagnostikuje respirační viry, jak pomocí přímého průkazu (PCR, kultivace), tak i za využití průkazu nepřímého (sérologie). Nejhojněji využívanou metodou je RT-PCR a z výše uvedného grafu číslo 8 je vidět, že téměř 90% laboratorní je prováděno právě pomoci této metody. PCR metoda je rychlá a dostatečně citlivá pro potřeby laboratoře. Sérologické metody, které v celkovém počtu vyšetření zabírají zhruba 10 %, fungují na principu detekce a sledování dynamiky protilátek v odebraných párových sérech. Na provedení jsou tyto metody časově náročnější a vyžadují i náročnější preanalytickou přípravu. Interpretace výsledků je u sérologických metod rovněž obtížnější. Zbylá 2% patří kultivaci. Viry jsou obecně náročnější na kultivační podmínky oproti například některým druhům bakterií, kterým stačí krevní agar a vhodná kultivační teplota. Buněčné kultury se upravují přesnou a složitou metodikou a na odečtení výsledků je třeba zkušený personál. O provední jednotlivých vyštření se vede přesný záznam, který se jednou měsíčně vykazuje Státnímu zdravotnímu ústavu, který sestavuje statistické záznamy. Nejčastěji diagnostikovaným respiračním infektem je chřipka typu A, kromě agresivity onemocnění je třeba brát v potaz i sezónní charakter onemocnění, který můžeme pozorovat převážně v zimním období od listopadu do března.
U nepřímého průkazu, kde sledujeme přítomnost a dynamiku imunoglobulinů je důležité načasovat správný čas odběru vzorku. Ideální dobou je zhruba třetí až pátý den od počátku infekce. I přes větší časovou náročnost sérologických a kultivačních metod mají nezastupitelnou roli v laboratorní diagnostice. HIT a KFR jsou častými metodami využívané ke stanovení chřipkových virů a respiračního syncitiálního viru, který je druhým nejvíce se vyskytujícím respiračním virem ve vyšetřovaném období ze vzorků dodaných do laboratoře.

BIBLIOGRAFIE

1. **KUTHAN, Martin.** Hybridizační metody studia nukleových kyselin. *Živa.* [Online] 2009. [Citace: 6. 10 2019.] http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/hybridizacni-metody-studia-nukleovych-kyselin.pdf.

2. **TERTTI,R. E., K. GRANFORS, R. LAHESMAA-RANTALA, K PEKKOLA-HEINO, A TOIVANEN.** Role of antibodies in the opsonization of Yersinia spp. *American society for microbiology, incestion and Imunity.* [Online] PMC, US National Library of Medicine, 5 1988. [Citace: 21. 10 2019.] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC259812/. PMC259812.

3. **SCHINDLER, Jiří.** *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů.* Praha : Grada Publishing, a.s., 2010. 978-80-247-3170-4.

4. **KEPLER A. Davis, Justin J. STEWART, Helen K. CROUCH, Christopher E. FLOREZ, Duane R. HOSPENTHAL.** Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Nares Colonization at Hospital Admission and Its Effect on Subsequent MRSA Infection. *IDSA, Infectious diseases Society of Amerika.* [Online] 15. 9 2004. [Citace: 23. 9 2019.] https://academic.oup.com/cid/article/39/6/776/357618. 10.1086/422997.

5. **HOMOLKA, Jiří.** *Tuberkulóza, Učební texty, Univerzita Karlova.* Praha : Charles University in Prague, Karolinum Press, 2017. 8024634767, 9788024634760.

6. **BÁRTŮ, Václava.** Tuberkulóza- infekční choroba v 21. století . *Medicína pro praxi.* 2008, Sv. 5 (6), 245-248.

7. **KAŠÁK, Viktor.** Diagnostika a léčba komunitní penumonie v ambulantní praxi. *Interní medicína pro praxi.* 1, 2004.

8. **VANČÍKOVÁ, Zuzana.** Komunitní pneumonie u dětí. *ZAM, Zdravotnictví a medicína* . [Online] 13. 6 2008. [Citace: 4. 11 2019.] https://zdravi.euro.cz/denni-zpravy/profesni-aktuality/komunitni-pneumonie-u-deti-363783.

9. **PARKHILL, J., SEBAIHIA, M., PRESTON, A. et al.** Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. *Nature genetics.* 32-40 (2003), 23. 7 2003, Sv. 35.

10. **THURLBECK M. William, Andrew M. CHURG, Jeffrey L. MYERS, Henry D. TAZELAAR, Joanne L. WRIGHT.** *Thurlbeck's Pathology of the Lung.* místo neznámé : Thieme, 2005. 1588902889, 9781588902887.

11. **WILKINS, Lippincott, Williams** *Lippincott's Nursing Procedures Fifth Edition.* místo neznámé : Wolters Kluwer, 2009. 0781786894, 9780781786898.

12. **VANPEPERSTRAETEV, F.** *The Cartilaginous Skeleton of the Bronchial Tree.* místo neznámé : Springer Science & Business Media, 2012. 3642952526, 9783642952524.

13. **ŠPINAR Jindřich, Ondřej LUDKA, kolektiv.** *Propedeutika a vyšetřovací metody vnitřních nemocí: 2., přepracované a doplněné vydání.* místo neznámé : Grada Publishing a.s., 2013. 802478375.

14. **MODROW Susanne , Dietrich FALKE, Uwe TRUYEN, Hermann SCHÄTZL.** *Molekulare Virologie.* místo neznámé : Springer-Verlag, 2010. 3827422418, 9783827422415.

15. **Rex Bookstore,** *Human Anatomy' 2007 Ed.2007 Edition.* místo neznámé : Rex Bookstore, Inc., 2007. 0071259716, 978007125971.

16. **KOUSALYA, Prabahar.** *Pediatric Upper Respiratory Tract Infection. Prescribing Pattern and Health Economics.* místo neznámé : Anchor Academic Publishing, 2017. 3960671377, 9783960671374.

17. **POON, Timothy K. W. CHENUNG a L. M. LEO.** Biology of Influenza A Virus. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES.* [Online] 23. 4 2007. [Citace: 2019. 11 27.] https://pdfs.semanticscholar.org/5969/24eecc1ac0b156d13071a0e515410f4ea470.pdf. 17470908.

18. **PAYNE, Susan.** *Viruses: From Understanding to Investigation.* místo neznámé : Academic Press, 2017. 0128031107, 9780128031100.

19. **NAVRÁTIL. Leoš, kolektiv.** *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory: 2., zcela přepracované a doplněné vydání.* místo neznámé : Grada Publishing a.s., 2017. 8027102103, 9788027102105.

20. **KOTT Otto, Iveta PETŘÍKOVÁ.** *Vybrané kapitoly anatomie gastrointestinálního a respiračního systému.* Plzeň : Západočeská univerzita v Plzni, 2009. 978-80-7043-796-4.

21. **ZAZULA Roman, Ivo SCHINDLER, Antonín SPÁLENÝ, Martina VAŠÁKOVÁ, Juraj DUTKA** Současný pohled na mykotické plicní infekce. *Interní medicína pro praxi.* 2005, 7-8.

22. **MELTER Oto, Annika, MALMGREN.** *Principy a praktika lékařské mikrobiologie.* Praha : Karolinum Press, 2014. 8024624141, 9788024624143.

23. **BEDNÁŘ, M., V. FRAŇKOVÁ, J. SCHINDLER, A. SOUČEK, J. VAVRA.** *Lékařská mikrobiologie.* Praha : Marvil, 1996.

24. **KRSTIC, Radivoj V.** *Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology.* místo neznámé : Springer Science & Business Media, 1991. 3662026767, 9783662026762.

25. **KOŠŤÁLOVÁ, Petra.** Postup při odběru hemokultury v intenzivní péči. *Diplomová práce.* Brno : Masarykova univerzita, 2017.

26 **VOTAVA,Miroslav kol.** *Lékařská mikrobiologie- Vyšetřovací metody.* Brno : Neptun, 2010. 978-80-86850-04-8.

27. **PAGANA Kathleen Deska, Timothy J. PAGANA.** *Mosby's Diagnostic and Laboratory Test Reference.* místo neznámé : Elsevier Health Sciences, 2010. 0323080146, 9780323080149.

28.**MICHÁLKOVÁ K., Z. ZEMANOVÁ.** Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi. *Klinická biochemie a metabolismus.* [Online] 24. 2 2005. [Citace: 6. 10 2019.] http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/KBM0502-63.pdf.

29. **CARRATALA, J , F GUDIOL , R. PALLARES , J. DORCA , R. VERDAGUER , J. ARIZA, F. MANRESA.** Risk factors for nosocomial Legionella pneumophila pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* [Online] ATS Journals, 1 1994. [Citace: 4. 11 2019.] https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.149.3.8118629. 8118629.

30. **IONESCU, Clara Mihaela.** *The Human Respiratory System: An Analysis of the Interplay between Anatomy, Structure, Breathing and Fractal Dynamics.* místo neznámé : Springer Science & Business Media, 2013. 144715388X, 9781447153887.

31. **HEJNAR, Petr.** *Sérologická diagnostika chlamydiových infekcí a toxoplazmózy.* [Přehledné články] Ústav mikrobiologie LF UP, Olomouc : www.prakticka-medicina.cz , 2001/7. 151100002.

32. **GITHUI, W, F, KITUI , Juma ES , Obwana DO , Mwai J , KWAMANGA.** A comparative study on the reliability of the fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *East African Medical Journal.* 1. 5 1993.

33. **MOSTAFA, Ghanei.** *Respiratory Diseases.* místo neznámé : BoD – Books on Demand, 2012. 9533079649, 9789533079646.

34. **MAYER,François L. Duncan WILSON, Bernhard HUBE.** Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Taylor and Francis online.* [Online] 9. 1 2013. [Citace: 2. 12 2019.] https://doi.org/10.4161/viru.22913.

35. **PASSARGE, Eberhard.** *Barevný atlas genetiky: překlad 5. vydání.* místo neznámé : Grada Publishing a.s., 2019. 8024730995, 9788024730998.

36. **MCGEE, Lesley. Diseases, National Center for Immunization and Respiratory.** Chapter 8: Identification and Characterization of Streptococcus pneumoniae. *CDC Centers for disease Control and Prevention.* [Online] 15. 4 2016. [Citace: 21. 10 2019.] https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt08-id-characterization-streppneumo.html.

37. **KNIPE, David Mahan, Peter M. HOWLEY.** *Fields' Virology, Svazek 1.* místo neznámé : Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 0781760607, 9780781760607.

38. **HARRISON, D.F.N., Donald FREDERICK, Norris HARRISON.** *The Anatomy and Physiology of the Mammalian Larynx.* místo neznámé : Cambridge University Press, 1995. 0521453216, 9780521453219.

39. **CYTOL, J.** Diagnostic utility of bronchoalveolar lavage. *US National Library of Medicine National Institutes of Health.* [Online] Journal List, Jul-Sep 2014. [Citace: 3. 8 2019.] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4274523/. PMC4274523.

40. **CONDE, Vanessa R.** *The basics of hematology, complete blood count and clotting: Guide & notes for Chinese and complementary medicine students and beginners.* místo neznámé : Vanessa R. Conde, 2018, 2018.

41. **CLEMENTE, Carmine D.** *Clemente's Anatomy Dissector: Guides to Individual Dissections in Human Anatomy with Brief Relevant Clinical Notes (applicable for Most Curricula).* místo neznámé : Lippincott Williams & Wilkins, 2010. 1608313840, 9781608313846.

42. **GAYLENE, Altman.** *Fundamental and Advanced Nursing Skills.* místo neznámé : Cengage Learning, 2009. 1111800286.

43. www.uia.fnplzen.cz. *Fakultní nemocnice Plzeň- ústav imunologie a alergologie.* [Online] [Citace: 5. 5 2019.] https://uia.fnplzen.cz/cs/node/769.

44. Hemokultury. *Institut klinické a experimentální mediciny.* [Online] [Citace: 3. 8 2019.] https://www2.ikem.cz/plm_lp/HVEZDALAJP.htm.

45. **SCHARFEN, Josef ml.** *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii.* místo neznámé : Nucleus HK, 2013. ISBN-13: 978-80-87009-32-1 .

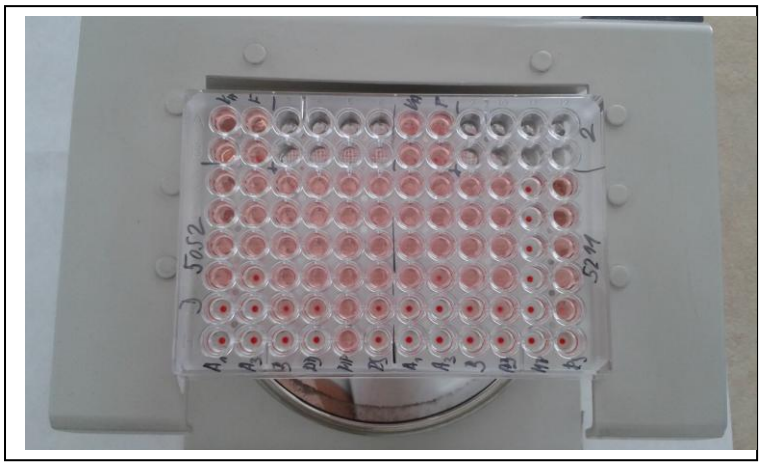
46. *Laboratorní příručka oddělení mikrobiologie.*

47. *Interní materiály a obrázky oddělení Virologie FN Plzeň.*

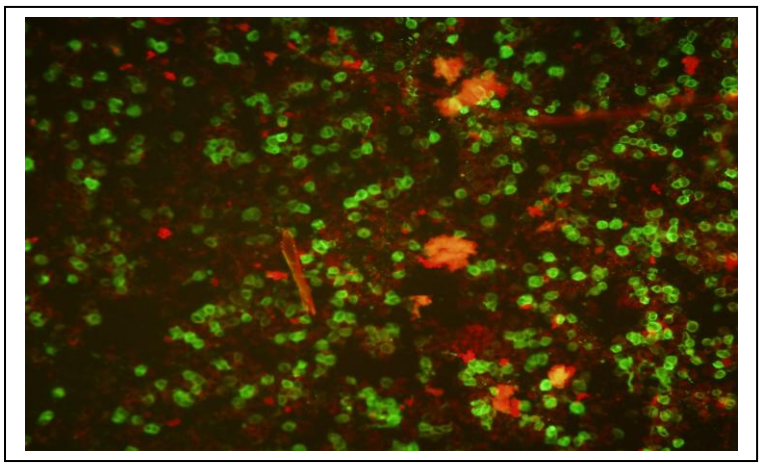
SEZNAM PŘÍLOH

- Obrázková příloha
- Vzor žádanky o mikrobiologické vyšetření virologie, sérologie, parazitologie

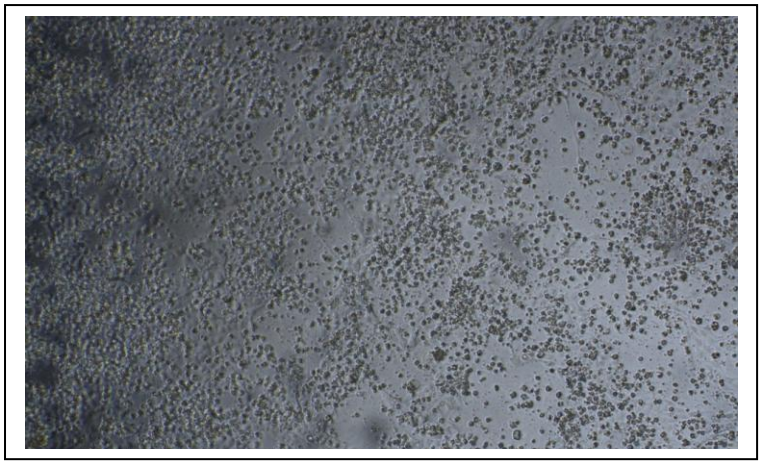
PŘÍLOHY – OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA



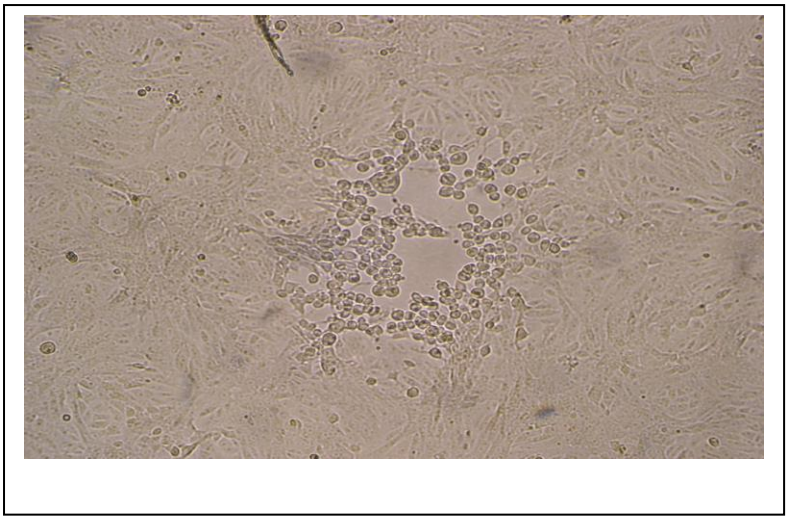
Obrázek 4 Serokonverze Mycoplasma pneumonie KFR - Zdroj Virologické oddělení FN Bory



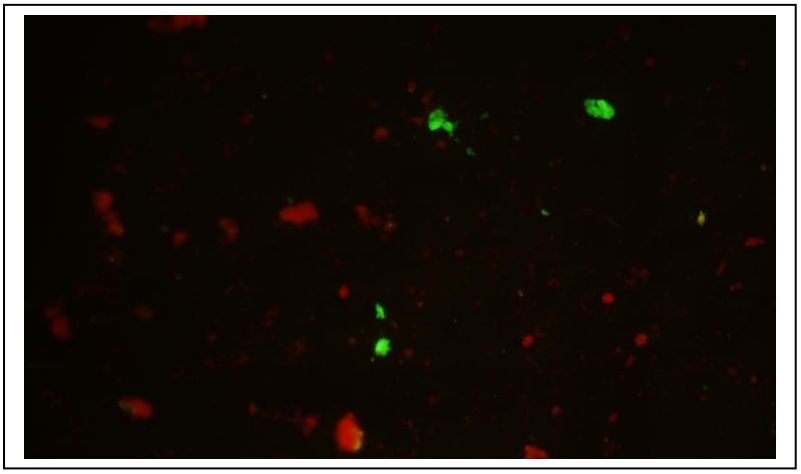
Obrázek 5 Respirační syncitiální virus , Imunofluorescenční detekce - Zdroj: Virologické oddělení FN Bory



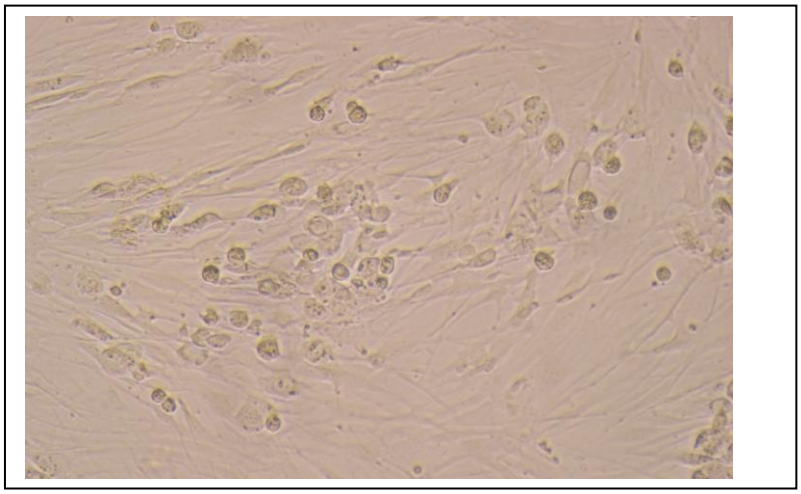
Obrázek 6 Chřipka typu A1 MDCK - Zdroj Virologické oddělení FN Bory



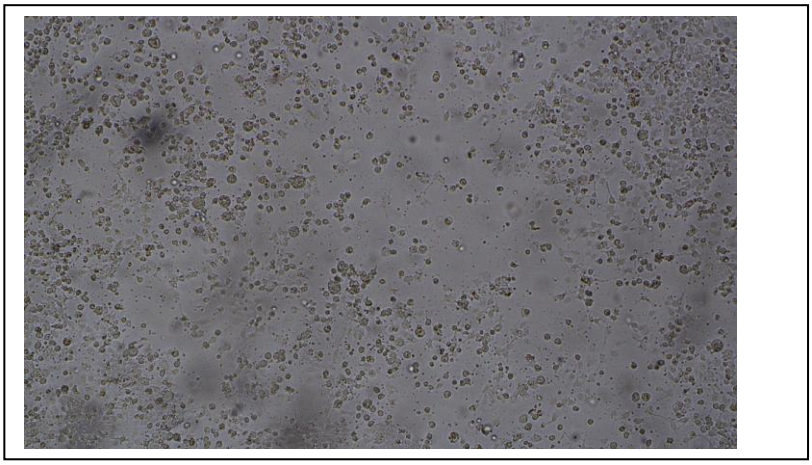
Obrázek 7VERO – HSV typ 2 – Zdroj Virologické oddělení FN Bory



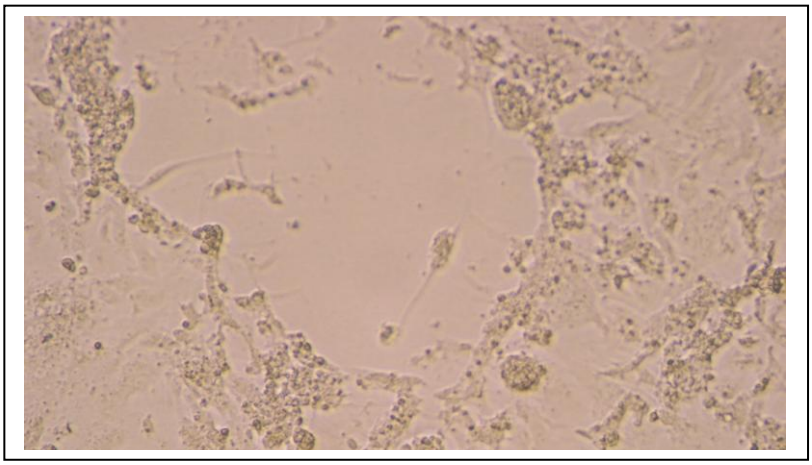
Obrázek 8 Parainfluenzavirus typu III, Imunofluorescenční detekce- Zdroj Virologické oddělení FN Bory



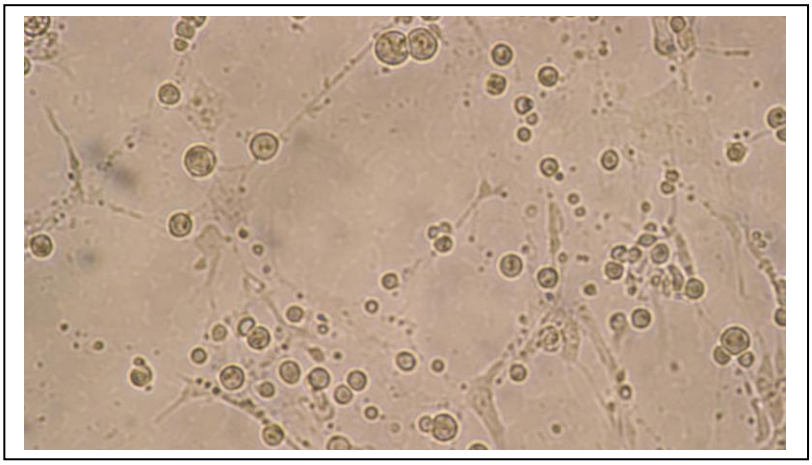
Obrázek 9 LMP, Adenovirus – Zdroj Virologiké oddělení FN Bory



Obrázek 10 MDCK, Chřipka typu B – Zdroj Virologické oddělení FN Bory

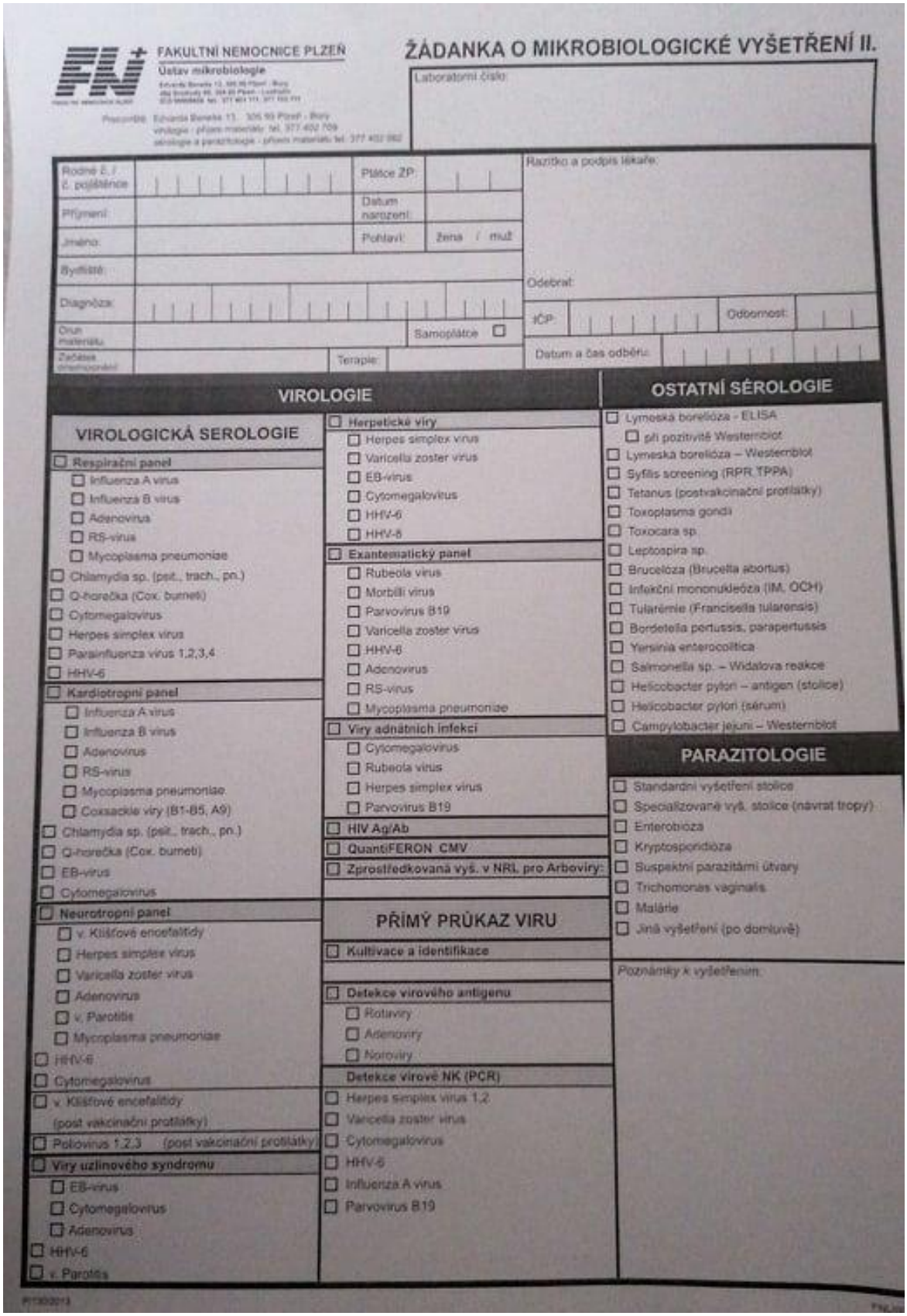


Obrázek 11 VERO, Respirační syncitiální virus – Zdroj Virologické oddělení FN Bory



Obrázek 12 LMP, HSV typu I – Zdroj Virologické oddělení FN Bory

PŘÍLOHA – LABORATORNÍ ŽÁDANKA FN PLZEŇ



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ
Ústav mikrobiologie

ŽÁDANKA O MIKROBIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ II.

Laboratorní číslo:

Rodné č. / č. pojištěnce | Plátce ZP | Razítko a podpis lékaře:
Příjmení | Datum narození
Jméno | Pohlaví: Žena / muž
Bydliště
Diagnóza | Odebrat:
Druh materiálu | Samoplátce ☐ | IČP | Odoonost
Začátek onemocnění | Terapie | Datum a čas odběru

VIROLOGIE

VIROLOGICKÁ SEROLOGIE

- ☐ **Respirační panel**
  - ☐ Influenza A virus
  - ☐ Influenza B virus
  - ☐ Adenovirus
  - ☐ RS-virus
  - ☐ Mycoplasma pneumoniae
- ☐ Chlamydia sp. (psit., trach., pn.)
- ☐ Q-horečka (Cox. burneti)
- ☐ Cytomegalovirus
- ☐ Herpes simplex virus
- ☐ Parainfluenza virus 1,2,3,4
- ☐ HHV-6
- ☐ **Kardiotropní panel**
  - ☐ Influenza A virus
  - ☐ Influenza B virus
  - ☐ Adenovirus
  - ☐ RS-virus
  - ☐ Mycoplasma pneumoniae
  - ☐ Coxsackie viry (B1-B5, A9)
- ☐ Chlamydia sp. (psit., trach., pn.)
- ☐ Q-horečka (Cox. burneti)
- ☐ EB-virus
- ☐ Cytomegalovirus
- ☐ **Neurotropní panel**
  - ☐ v. Klíšťové encefalitidy
  - ☐ Herpes simplex virus
  - ☐ Varicella zoster virus
  - ☐ Adenovirus
  - ☐ v. Parotitis
  - ☐ Mycoplasma pneumoniae
- ☐ HHV-6
- ☐ Cytomegalovirus
- ☐ v. Klíšťové encefalitidy (post vakcinační protilátky)
- ☐ Poliovirus 1,2,3 (post vakcinační protilátky)
- ☐ **Viry uzlinového syndromu**
  - ☐ EB-virus
  - ☐ Cytomegalovirus
  - ☐ Adenovirus
- ☐ HHV-6
- ☐ v. Parotitis

- ☐ **Herpetické viry**
  - ☐ Herpes simplex virus
  - ☐ Varicella zoster virus
  - ☐ EB-virus
  - ☐ Cytomegalovirus
  - ☐ HHV-6
  - ☐ HHV-8
- ☐ **Exantematický panel**
  - ☐ Rubeola virus
  - ☐ Morbilli virus
  - ☐ Parvovirus B19
  - ☐ Varicella zoster virus
  - ☐ HHV-6
  - ☐ Adenovirus
  - ☐ RS-virus
  - ☐ Mycoplasma pneumoniae
- ☐ **Viry adnátních infekcí**
  - ☐ Cytomegalovirus
  - ☐ Rubeola virus
  - ☐ Herpes simplex virus
  - ☐ Parvovirus B19
- ☐ **HIV Ag/Ab**
- ☐ **QuantiFERON CMV**
- ☐ **Zprostředkovaná vyš. v NRL pro Arboviry:**

PŘÍMÝ PRŮKAZ VIRU

- ☐ **Kultivace a identifikace**
- ☐ **Detekce virového antigenu**
  - ☐ Rotaviry
  - ☐ Adenoviry
  - ☐ Noroviry
- **Detekce virové NK (PCR)**
  - ☐ Herpes simplex virus 1,2
  - ☐ Varicella zoster virus
  - ☐ Cytomegalovirus
  - ☐ HHV-6
  - ☐ Influenza A virus
  - ☐ Parvovirus B19

OSTATNÍ SÉROLOGIE

- ☐ Lymeská borelióza - ELISA
  - ☐ při pozitivitě Westernblot
- ☐ Lymeská borelióza – Westernblot
- ☐ Syfilis screening (RPR, TPPA)
- ☐ Tetanus (postvakcinační protilátky)
- ☐ Toxoplasma gondii
- ☐ Toxocara sp.
- ☐ Leptospira sp.
- ☐ Bruceloza (Brucella abortus)
- ☐ Infekční mononukleóza (IM, OCH)
- ☐ Tularémie (Francisella tularensis)
- ☐ Bordetella pertussis, parapertussis
- ☐ Yersinia enterocolitica
- ☐ Salmonella sp. – Widalova reakce
- ☐ Helicobacter pylori – antigen (stolice)
- ☐ Helicobacter pylori (sérum)
- ☐ Campylobacter jejuni – Westernblot

PARAZITOLOGIE

- ☐ Standardní vyšetření stolice
- ☐ Specializované vyš. stolice (návrat tropy)
- ☐ Enterobioza
- ☐ Kryptosporidióza
- ☐ Suspektní parazitární útvary
- ☐ Trichomonas vaginalis
- ☐ Malárie
- ☐ Jiná vyšetření (po domluvě)

Poznámky k vyšetřením: