



1. Pracovní konference zdravotních laborantů a zdravotních sester

Miroslava Topínková

Oddělení bakteriologie a mykologie

V přednáškovém sále Domova sester Fakultní nemocnice Ostrava se 18. května 2011 konala společná vzdělávací akce Fakultní nemocnice Ostrava a Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě 1. Pracovní konference zdravotních laborantů a zdravotních sester.

Téměř dvě stovky účastníků této konference zaujaly zvláště bloky sdělení, které se týkaly problematiky prasečí chřipky (pohled patologa, mikrobiologa a biochemika), MRSA (doplněné o zajímavé kasuistiky, na které navazovaly prezentace s výsledky laboratorních vyšetření Zdravotního ústavu) nebo praktický blok zaměřený na podmínky odběru biologického materiálu. Velmi upoutaly také prezentace zdravotních sester z oborů neonatologie, infekčního lékařství a chirurgie.

Další zajímavá odborná sdělení si mohou odborní pracovníci ve zdravotnictví vyslechnout na **2. Pracovní konferenci zdravotních laborantů a zdravotních sester**, která se bude konat **10. listopadu 2011** (podrobné informace budou zveřejněny na www.zu.cz).

Laboratorní diagnostika neuroborreliózy

Hana Bílková Fránková

Oddělení parazitologie a lékařské zoologie

V našich podmínkách přenášejí borreliu klíšťata - *Ixodes ricinus*. Typickým biotopem pro klíšťata je listnatý nebo smíšený les, ale i městský park, kde na vegetaci blízko nad zemí a v typickém postoji, kdy stojí na třech zadních párech nohou a s prvním párem nohou rozevřeným, čekají na svého hostitele...

strana 2

Průzkum druhového zastoupení kampylobakterů ve vzorcích stolic

Daniela Stuchlíková, Tomáš Kutlák, Jana Niemczyková

Oddělení bakteriologie a mykologie

Bakterie rodu *Campylobacter* jsou součástí fyziologické flóry zvířat nebo zvířecími podmíněnými patogeny. K přenosu na člověka dochází alimentární nákazou nebo přímým kontaktem. Řadí se mezi nejčastější původce gastroenteritid...

strana 4

Laboratorní diagnostika infekcí virem Epstein-Barrové

Hana Zelená, Jan Raszka

Oddělení virologie

Virus Epstein-Barrové (EBV) neboli lidský herpesvirus 4 (HHV-4) patří společně s HHV-8 do podčeledi *Gammaherpesvirinae*. V roce 1968 byl virus EBV prokázán jako původce infekční mononukleózy (IM). EBV je nejběžnějším původcem IM, avšak obdobné symptomy mohou způsobovat i jiná agens, např. cytomegalovirus (CMV), lidský herpesvirus 6 (HHV-6), adenovirus, virus zarděnek, příušnic, HIV, virus hepatitidy A...

strana 5

Význam rychlých metabolických vyšetřovacích metod pro záchyt mykobakterií z klinických vzorků

Jiřina Štolaříková, Vít Ulmann, Dagmar Štěrčíková

Laboratoř pro diagnostiku mykobakterií

Tuberkulóza představuje významný problém světového zdravotnictví a je jednou z hlavních příčin úmrtí na infekční choroby ve světě. Dle WHO se odhadovalo v roce 2009 asi 9,4 mil. nemocných na tuberkulózu, na toto onemocnění umírá asi 2 mil. lidí ročně.

strana 7

Vyšetření protilátek proti vlasovým folikulům u alopecia areata

Jana Motlochová

Oddělení imunologie a alergologie

Příčina vypadávání vlasů může být jednak vnější (exogenní) způsobená chemickými (trvalá, barvení), mechanickými (různé účesy) a fyzikálními vlivy nebo vnitřní (endogenní) jako důsledek nemoci, špatné výživy, vypadávání vlasů podmíněné medikamentózně, přirozené ztráty vlasů, po těhotenství, genetické podmíněnosti.

strana 9

Nové možnosti identifikace mikroorganismů

Tereza Škapová

Laboratoř bakteriologie Ostrava

Mezi tradiční metody identifikace mikroorganismů náležejí mikroskopie, růst na selektivních nebo selektivně-diagnostických půdách a stanovení biochemických vlastností izolovaných mikroorganismů.

strana 10

Činnost obchodního oddělení

Pavel Jurčík

Oddělení obchodní

strana 11

Elektronická distribuce laboratorních výsledků

Jiří Ševeček

Oddělení informačních a telekomunikačních technologií

strana 12

Neuroborrelióza

Podle Velkého lékařského slovníku je „neuroborrelióza - neurologická forma Lymeské borreliózy. Může se projevit četnými příznaky a chorobnými stavy, které mnohdy napodobují jiné nervové choroby. Jde např. o bolesti hlavy, únavový syndrom, obrny (zejména hlavových nervů, nejč. lícniho), velmi bolestivé záněty míšních kořenů (radikulitidy), záněty mozku či mozkových blan...“

Mezi základní laboratorní metody pro diagnostiku časně i chronické neuroborreliózy patří dle doporučení European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (www.eucalb.com) průkaz intratékální syntézy specifických protilátek. Pouhé stanovení koncentrace imunoglobulinů v likvoru je nedostačující, neodlišíme tak intratékální a krevní původ imunoglobulinů. Dle European Federation of Neurological Societies (www.efns.org) by měla být pro potvrzení diagnózy lymeská borrelióza splněna 3 kritéria:

- 1) Intratékální produkce specifických protilátek
- 2) Známký zánětu v likvoru pleocytóza v CSF
- 3) Průkaz přítomnosti borélií kultivací a metodou PCR.

Při aplikaci všech tří kritérií je však nutné mít na paměti, že:

- v časně fázi může být intratekání produkce protilátek neprokazatelná, na straně druhé pozitivní AI může být detekován i roky po prodělané infekci
- normální počet buněk je u lymeské neuroborreliózy vzácný, ale je možný v časně fázi onemocnění nebo u pacientů pod imunosupresi
- kultivace borélií je obtížná, časově náročná a málo citlivá a PCR je vázána na velmi časnou fázi onemocnění a na cílený odběr materiálu.

Lymeská borrelióza,

Borrelia burgdorferi sensu lato

Lymeská borrelióza je v našich klimatických podmínkách nejčastější infekci přenášenou krevsajícím členovci. *Borrelia burgdorferi s. lato* je mikroaerofilní, gramnegativní spirocheta (0,2 až 0,5 x 3 až 20 μm) s pravidelnými závitými a bičíky, kterých je 7 až 11. Bičíky vystupují na obou koncích buňky z bazálních disků.

Buněčná stěna borélií se sestává z tří vrstev - vnitřní peptidoglykanové, střední lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové. Velká flexibilita membrán buněčné stěny umožňuje tvorbu cyst a vylučování membranózních vezikulů, které obsahují plazmidovou výbavu. Způsob organizace genetického materiálu je mezi bakteriemi unikátní, chromozom a některé plazmidy mají lineární charakter. (2)

Klíště obecné, *Ixodes ricinus*

V našich podmínkách přenášejí borrelie klíšťata - *Ixodes ricinus*. Typickým biotopem pro klíšťata je listnatý nebo smíšený les, ale i městský park, kde na vegetaci blízko nad zemí a v typickém postoji, kdy stojí na třech zadních párech nohou a s prvním párem nohou rozevřeným, čekají na svého hostitele. Jsou slepá, ale na konci terminálního článku prvního páru nohou mají

Hallerův orgán s chemo- a mechanoreceptory, kterými dokáží vycítit potencionálního hostitele.

Krev sají pouze samice, samci se živí rostlinnou mizou. Vyskytují se ve čtyřech vývojových stádiích - vajíčko, šestinohá larva, osminohá nymfa a imago. Každé přeměně musí předcházet sání, přičemž jednotlivá stádia sají jen jednou (na zvířecím hostiteli sají larvy 2-3 dny, nymfy 5-6 dnů, dospělé samice 10-12 dnů). Po páření, které může probíhat na hostiteli i mimo něj, klade samice až 5000 vajíček. Přezimují v kterémkoliv stadiu vývoje, v hladovém i nasátém stavu, probouzejí se již při teplotách nad 5°C.

U klíšťat funguje transstadiální a transovariální přenos virů a bakterií. Celý vývojový cyklus klíštěte je dlouhý, v našich podmínkách obvykle trvá 2-3 roky. Při sání vpouští klíště do ranky farmakologicky aktivní sliny s protizánětlivými a protisrážlivými aktivními látkami, které potlačují imunitní odpověď hostitele, což chrání klíště samotné a rovněž usnadňuje průnik bakterií či virů do nového hostitele.

U člověka se uplatňují vedle borélií zejména také flaviviry vyvolávající klíšťovou encefalitidu. Zatímco proti klíšťové encefalitidě existuje účinné očkování, u borreliózy zatím vakcína nebyla vyvinuta. Mezi další onemocnění, která mohou klíšťata přenést na člověka patří babezióza, rickettsiáza, bartonelóza či ehrlichioza.

Laboratorní diagnostika borreliózy

Přímé metody

- Kultivace: časově náročná metoda s nízkou senzitivitou. V našich laboratořích standardně neprovádíme.
- PCR: vhodná zejména pro časná stádia onemocnění. Máme zavedenu metodu RT PCR, založenou na principu amplifikace chromozomálního genu kódujícího 16S rDNA, která detekuje klinicky významné patogenní druhy borélií ze sk. *Borrelia burgdorferi s. lato* (*B. b. sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. luisitanae*, *B. andersonii*, *B. bisetii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica*)
- Elektronová mikroskopie: omezené použití, nutný odběr materiálu, kde skutečně můžeme borrelie očekávat. Metodu máme, zavádíme.

Nepřímé metody

- Průkaz specifických protilátek metodou ELISA
- Průkaz přítomnosti protilátek proti separovaným antigenům borélií metodou immunoblot

ELISA

Vzhledem k nízké senzitivě a časově náročnosti kultivace, sporným výsledkům PCR metody a složitosti průkazu borélií elektronovou mikroskopií je detekce specifické protilátkové odpovědi vhodnou a doporučenou metodou pro průkaz probíhajícího onemocnění. Vhodné je využívat dvoukrokový postup:

- 1) průkaz přítomnosti specifických anti IgG a anti IgM imunoenzymaticky (ELISA)
- 2) průkaz přítomnosti IgG a IgM protilátek proti jednotlivým, vysoce specifickým, elektroforetický rozděleným antigenům, metodou

immunoblot.

Pro stanovení přítomnosti protilátek metodou EIA využíváme komerčně dostupná diagnostika české firmy TEST LINE - EIA *Borrelia* recombinant. Souprava umožňuje pracovat s lidským sérem, plazmou, synoviální tekutinou a mozkomíšním mokem. Pro stanovení anti IgG odpovědi jsou do jamek mikrotitrační destičky, do nichž jsou aplikovány vyšetřované vzorky, navázány purifikované antigeny z vybrané části specifických antigenů VlsE (variable major protein-like sekvence, expressed), p83, vnitřního flagelinu (p41i), p39, OspC a p17 druhů *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Pro anti IgM pak antigeny z vybraných částí specifického OspC (outer surface protein, p25), vnitřního flagelinu p41i a p 39. Pro anti IgG je garantována 98,9 % citlivost a 97, 8% specifita, pro anti IgM 98,9% citlivost a 96,7 % specifita.

Souprava zároveň umožňuje pracovat s mozkomíšním mokem, kde je nutné pro správnou interpretaci výsledků pracovat s tzv. protilátkovým indexem (antibody index AI).

Antibody index (AI)

Výsledkem detekce intratékální produkce specifických antiborreliových protilátek je Antibody Index, což je poměr koncentrace specifických protilátek v likvoru a v séru ve vztahu ke stavu hematolikvorové bariéry a koncentraci celkových imunoglobulinů v likvoru a v séru. Podmínkou stanovení je vzorek venózní srážlivé krve a likvoru odebraný současně, stanovení hodnot koncentrace albuminu, stanovení celkových imunoglobulinů IgM a IgG v likvoru i séru.

Zvýšení permeability hematoencefalické a hemato-likvorové bariéry při neuroinfekcích signalizuje patologické změny v CNS. Změna je dána úsilím organismu poskytnout CNS látky s neuroprotektivním účinkem, umožňující efektivní průběh zánětlivého procesu.

Albumin je protein syntetizovaný v játrech, přítomnost v CSF je krevního původu.

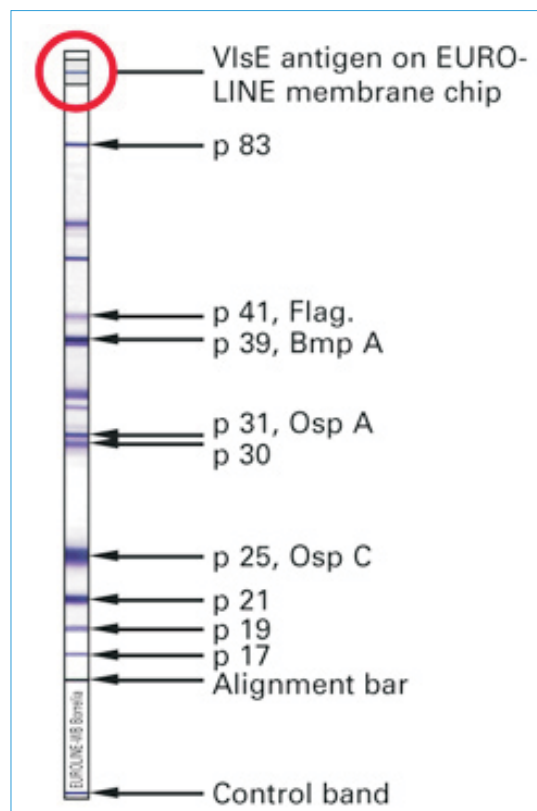
Specifické protilátky stanovujeme imunoenzymaticky, celkové IgG a IgM protilátky a hladinu albuminu stanovujeme nefelometricky.

Absolutní hodnoty absorbancí sér a likvorů jsou převedeny na tzv. arbitrární jednotky (AU) a poté je vypočtena hodnota protilátkového indexu dle Reibera. Z hodnot koncentrací albuminu a celkových Ig v séru a likvoru je vypočítán QAlb, což je poměr albuminu v likvoru a albuminu v séru. Hodnota QAlb udává stav hematolikvorové bariéry (normální, lehká porucha, střední porucha a těžká porucha hematolikvorové bariéry).

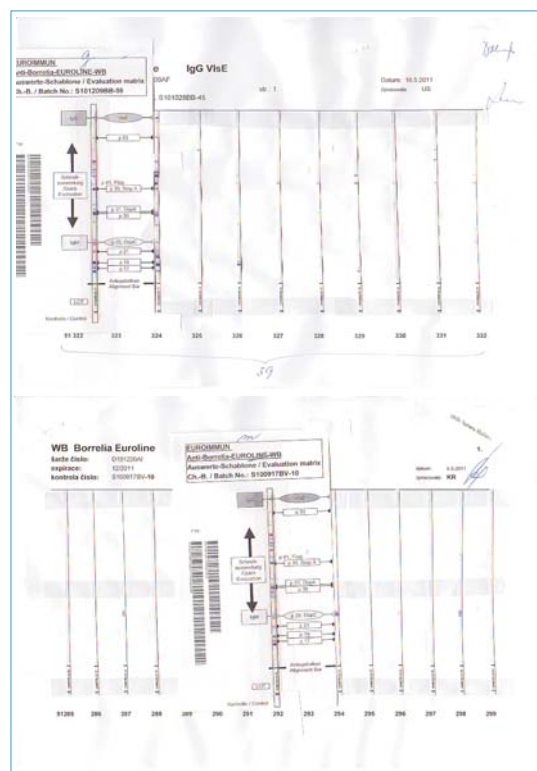
Immunoblot

Pro stanovení přítomnosti protilátek metodou immunoblot v séru (jde o kombinaci metod Western a Line blotu) pracujeme s německými diagnostiky f. Euroimmun (na český trh dodává f. Dynex). Mezi antigeny navázanými na nitrocelulóзовou membránu je také vysoce specifický purifikovaný rekombinantní antigen VlsE, který hraje klíčovou roli ve strategii přežití bakterie. Jednotlivé borrelia-specifické antigeny z hrubého antigenního extraktu jsou po otištění na membráně rozděleny dle jejich molekulové váhy v kDa a jejich poloha je výrobcem označena /obr. č.1/.

Pro stanovení přítomnosti protilátek metodou Westernblot v mozkomíšním moku používáme



Obrázek č.1 - Ukázka stripu s navázanými antigeny (souprava f. Euroimmun)



Obrázek č.2 - Ukázka výsledné pozitivní reakce v IgG (reakce na úrovni VlsE, p83, p39, p19 a p17; hraniční reakce na úrovni p30, OspA a p21), a v IgM (pozitivní reakce na úrovni OspC)

diagnostika f. TEST LINE (výrobce garantuje použití pro matrici mozkomíšní mok), které pracují se specifickými Ag *B. garinii* (p83, p 39, p30, OspA, OspC, p21, p19, p 17 a rekombinantním Ag VlsE)/obr. č. 2/.

Výsledky

V roce 2010 jsme vyšetřili celkem 481 pacientů, u nichž byl odebrán současně mozkomíšní mok a sérum (u dalších 66 dalších pacientů byl odebrán pouze mok, což je pro interpretaci výsledků podporujících nebo

zpochybnujících stanovení diagnózy nedostatečné).

U 15-ti pacientek v průměrném věku 56 let jsme prokázali pozitivní AI, přičemž ve 14-ti případech pouze pro anti IgG a v jednom případě pro anti IgG i anti IgM (tato pacientka byla zaslána k vyšetření s dg obrna lícního nervu). U těchto žen byla 4x zjištěna normální hematolikorová bariéra, lehká porucha bariéry byla zaznamenána 7x, střední porucha 2x.

U 14-ti mužů v průměrném věku 47 let s pozitivním AI jsme v 10-ti případech zjistili pozitivitu v anti IgG a 2x

v anti IgM. Ve 3 případech byla zjištěna pozitivita pro oba izotypy. U mužů byla pouze v jednom případě detekována normální hematolikorová bariéra, v 7 případech byla zaznamenána lehká porucha, 3x střední a 4x těžká porucha hematolikorové bariéry.

V současné době dále kompletujeme a ověřujeme data pacientů.

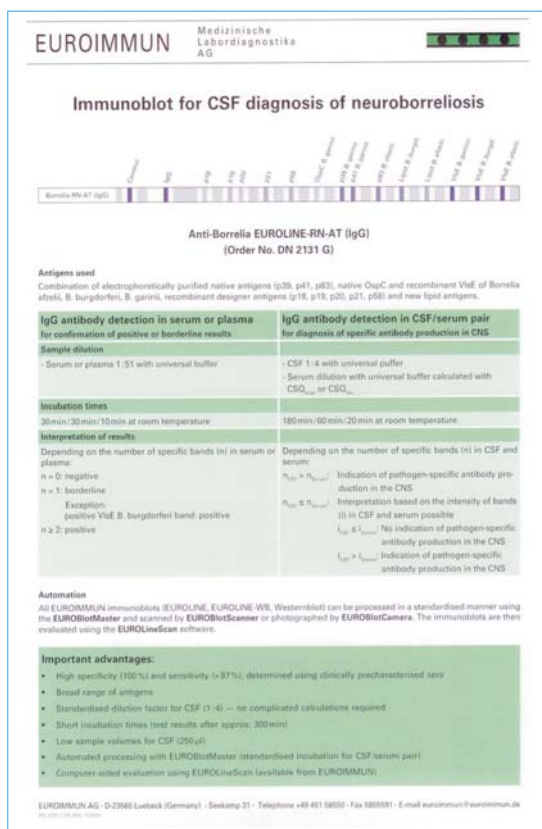
Kam dále

F. Euroimmun připravuje k uvedení na trh nový Immunoblot /obr. č.3/ pro doplnění diagnostické mozaiky neuroborreliózy. Immunoblot kombinuje purifikované nativní Ag p39, p41, p83, nativní antigen OspC, rekombinantní VlsE *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, *B. garinii*, rekombinantní p18, p19, p20, p21, p 58 a nové lipidové antigeny. Metoda je založena na hodnocení pozitivních reakcí na úrovni specifických antigenů v CSF a v séru. Je-li počet reakcí vyšší v likvoru než v séru, znamená to, že probíhá produkce specifických Ab v CSF. V opačném případě je zapotřebí hodnotit i intenzitu reakce.

O možnosti požadovat tento test Vás budeme informovat.

Literatura:

1. Vokurka, M., Hugo, J. a kol.: Velký lékařský slovník, Maxdorf, 2004
2. Bartůněk, P.: Lymeská borelióza, Grada Publishing, 1996
3. Valešová, M.: Lymeská artritida, Grada Publishing, 1999
4. Bartůněk, P.: Lymeská kardiitida, Grada Publishing, 1996
5. Reiber, H., Peter, J. B.: Cerebrospinal fluid analysis: diese-related data patterns and evaluation programs, Journal of the Neurological Sciences 184 (2001), 101-102
6. Ł. Mygland, U. Ljřstad, V. Fingerle, T. Rupprecht, E. Schmutzhard and I. Steiner: EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis, European Journal of Neurology 2010, 17: 8-16
7. Informační a příbalové letáky f. Test Line, www.test-line.cz (uveřejněno s vědomím firmy Test Line)
8. Informační a příbalové letáky f. Euroimmun, www.euroimmun.com, www.dynex.cz (uveřejněno s vědomím firmy Dynex)
9. Příbalový leták f. GeneProof, Borrelia burgdorferi, PCR Kit
10. www.eucalb.com
11. www.efns.org



Obrázek č. 3 - Immunoblot pro diagnostiku neuroborreliózy f. Euroimmun

Průzkum druhového zastoupení kamylobakterů ve vzorcích stolic vyšetřených v bakteriologické laboratoři Havířov

Daniela Stuchlíková, Tomáš Kutlák, Jana Niemczyková

Laboratoř bakteriologie Havířov

Bakterie rodu *Campylobacter* jsou součástí fyziologické flóry zvířat nebo zvířecími podmíněnými patogeny. K přenosu na člověka dochází alimentární nákazou nebo přímým kontaktem. Řadí se mezi nejčastější původce gastroenteritid, ale mohou vyvolávat i extraintestinální infekce (např. hepatitidy, sepse atd.), většinou pak jde o komplikace gastroenteritid.

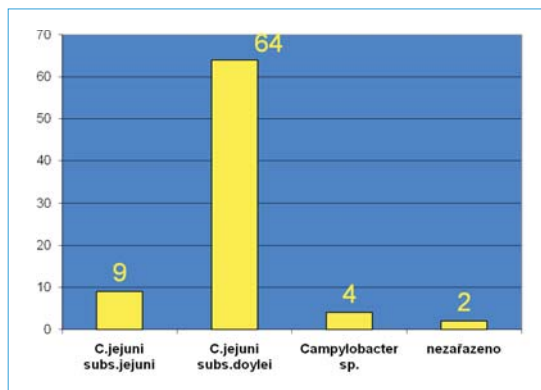
Identifikace kamylobakterů na našem oddělení se běžně provádí pomocí 24-48 hodin dlouhé kultivace vzorků stolic na selektivní půdě CAM, při 42 °C, v mikroaerofilní atmosféře (používáme anaerostat Oxoid + vyvíječ mikroaerofilního prostředí Oxoid CampyGen). Z šedobílých mukoidních kolonií vyrostlých na tomto médiu se zhotoví mikroskopický preparát, v němž lze potvrdit přítomnost G- drobných spirálovitých či zakřivených tyček až koků. K správnému dourčení napomáhá také pozitivní oxidázový test. Pomocí

hippurátového testu lze pak u zjištěné kultury kamylobakterů potvrdit jejich zařazení do druhu *Campylobacter jejuni*. Avšak schopnost hydrolyzovat hippurát nemají všechny bakterie tohoto druhu, a tak i negativní hippurátový test nevylučuje, že se nejedná o bakterie druhu *C. jejuni*.

Jelikož infekce tímto druhem může podnítit rozvoj pozdních následků kamylobakterové gastroenteritidy (tzv. Guillain Barré syndromu), rozhodli jsme se v období 01 až 03/2011 prozkoumat druhové zastoupení kamylobakterů ze vzorků stolic i s pomocí standardizovaného identifikačního systému Api Campy (bioMérieux). U zkoumaných kmenů jsme se pak zaměřili také na stanovení citlivosti k vybraným antibiotikům (tetracyklin, ciprofloxacín a erytromycin), vhodných k léčbě komplikovaných infekcí.

Ze 79 izolátů se nám pomocí Api Campy úspěšně

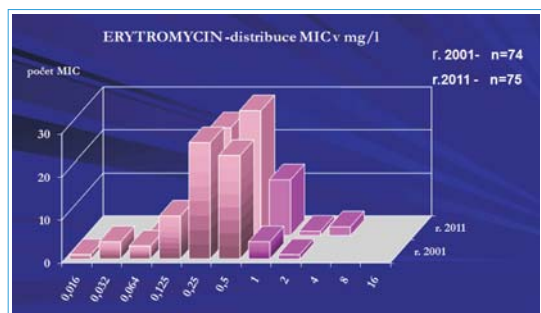
podářilo 64 kmenů přiřadit do druhu *C. jejuni subspecies doylei* a 9 do druhu *C. jejuni subspecies jejuni*. 4 kmeny byly vyhodnoceny jako *Campylobacter sp.* a pouze 2 zůstaly nezařazeny (viz obr. 1).



Obrázek č.1 - Výsledky identifikace kamylobakterů pomocí Api Campy

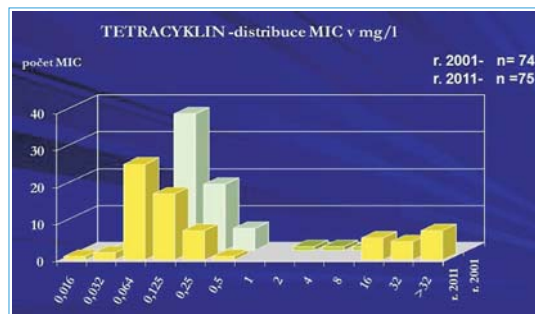
U 75 kmenů tohoto souboru byla citlivost ke zmiňovaným antibiotikům vyšetřena metodou definovaného gradientu čili E testy. Erytromycin jsme vybrali jako zástupce makrolidových antibiotik, používaných v léčbě těžkých forem onemocnění. U tetracyklinu a ciprofloxacinu jsme předpokládali změny citlivosti v čase.

Pro hodnocení, zjištěných hodnot byly použity breakpointy CLSI (dříve NCCLS) pro aeroby, jelikož pro kamylobaktery zatím definovány nejsou. Rezistentní kmeny k erytromycinu nebyly zjištěny. Ve srovnání s r. 2001 jsme zaznamenali určité změny - došlo k posunu hodnot MIC do oblasti intermediární citlivosti a sice podíl kmenů s hodnotou MIC 1,0 mg/l

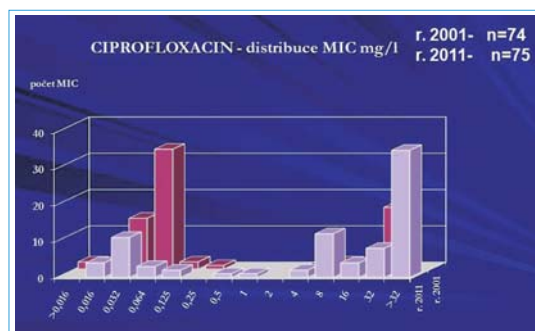


Obrázek č.2 - Distribuce zjištěných hodnot MIC erytromycinu u souboru sledovaných kmenů *Campylobacter sp.* v r. 2011 (druhá pozice na grafu), v porovnání s výsledky naší první studie z r. 2001 (první pozice na grafu).

se zvýšil z 7 % na 16 % (obr. 2). Tyto mírné změny v citlivosti kamylobakterů k erytromycinu mohou být prvním náznakem vývoje směrem k rezistenci. Je zde však možnost přechodného, sezónního charakteru výskytu určitého typu kmenů. Nelze rovněž vyloučit i uplatnění negativního vlivu použité metody (mikroaerofilního prostředí). Zvýšená tenze CO₂ může zvýšit okyselení půdy a tím i snížit účinek makrolidů.



Obrázek č.3 - Distribuce zjištěných hodnot MIC tetracyklinu u souboru sledovaných kmenů *Campylobacter sp.* v r. 2011 (druhá pozice na grafu), v porovnání s výsledky naší první studie z r. 2001 (první pozice na grafu).



Obrázek č.4 - Distribuce zjištěných hodnot MIC ciprofloxacinu u souboru sledovaných kmenů *Campylobacter sp.* v r. 2011 (druhá pozice na grafu), v porovnání s výsledky naší první studie z r. 2001 (první pozice na grafu).

V případě tetracyklinu došlo k jednoznačnému rozdělení populace kamylobakterů na kmeny buď dobře citlivé nebo kmeny s vysokým stupněm rezistence (v porovnání s r. 2001 zjištěn nárůst rezistence z 1 % na 25 %). Intermediárně citlivé kmeny nebyly zjištěny (obr. 3).

Obdobný trend byl zaznamenán i v případě ciprofloxacinu (obr. 4), avšak s tím rozdílem, že nárůst rezistence je pozvolný, s převahou kmenů s vysokým stupněm rezistence. Za období 10ti let se rezistence k ciprofloxacinu zvýšila z 29 % na 71 %.

Laboratorní diagnostika infekcí virem Epstein-Barrové

Hana Zelená, Jan Raszka

Oddělení virologie

Klinické projevy infekcí EBV

Virus Epstein-Barrové (EBV) neboli lidský herpesvirus 4 (HHV-4) patří společně s HHV-8 do podčeledi *Gammaherpesvirinae*. V roce 1968 byl virus EBV prokázán jako původce infekční mononukleózy (IM). EBV je nejběžnějším původcem IM, avšak obdobné symptomy mohou způsobovat i jiná agens, např. cytomegalovirus (CMV), lidský herpesvirus 6 (HHV-6), adenovirus, virus zarděnek, příušnic, HIV, virus hepatitidy A nebo *Toxoplasma gondii*. Rovněž pacienti

s lymfomy nebo některými typy akutní leukémie mohou mít obdobné příznaky a laboratorní nálezy jako jsou u infekční mononukleózy.

Primoinfekce virem EBV nejčastěji proběhne v dětství, u imunokompetentních malých dětí je zpravidla asymptomatická nebo se projeví jen jako lehké necharakteristické horečnaté onemocnění. S infekcí EBV se během svého života setká drtivá většina populace, pouze přibližně 5 % osob zůstává i v dospělosti EBV séronegativní. Proběhne-li primoinfekce u staršího dítěte

nebo mladého dospělého, přibližně v polovině případů se manifestuje jako infekční mononukleóza charakterizovaná kombinací příznaků: únava, nechutenství, nevolnost, bolest hlavy, horečka, tonzilitida, faryngitida, zvětšení krčních lymfatických uzlin, hepatitida, zvětšení sleziny, někdy kožní vyrážka. V laboratorním nálezu dominují zvýšené hodnoty jaterních enzymů, charakteristická je lymfocytóza s přítomností atypických lymfocytů (mononukleárů) v periferní krvi. Po proběhlé primoinfekci u imunokompetentních jedinců přechází EBV infekce do neproduktivní latentní fáze, kdy EBV přetrvává doživotně v B-lymfocytech aniž by svému nositeli způsobovala nějaké potíže.

V průběhu života se mohou vyskytnout epizody reaktivace latentní EBV infekce, zpravidla v souvislosti s imunodeficitem, stresem organismu nebo jinou probíhající infekcí. Při reaktivaci je virus vylučován slinami, obvykle není provázena klinickými příznaky, někdy se však může projevit jako faryngitida, zvýšená únavnost, zduření mízních uzlin, v laboratorním nálezu mohou být zvýšené hodnoty jaterních enzymů. Při chronické aktivní infekci EBV dochází k opakovaným reaktivacím provázeným klinickými příznaky, často je spojena s imunodeficitem. Je diskutována souvislost chronické EBV infekce nebo reaktivace s chronickým únavovým syndromem.

Velmi závažný, často fatální, je průběh infekce EBV u chlapců s vzácnou vrozenou chorobou, lymfoproliferativním syndromem vázaným na chromozom X (XLP). Závažná lymfoproliferativní onemocnění způsobuje EBV i u osob s jinými imunodeficity, např. po transplantacích a u HIV pozitivních.

EBV se podílí na patogenezi některých maligních onemocnění rovněž u imunokompetentních osob, např. Burkittův lymfom, nasofaryngeální karcinom, Hodgkinova choroba, lymfomy, lymfoepiteliomy, adenokarcinomy GIT a další.

EBV může být původcem některých neuroinfekcí a infekcí oka (uveitidy, keratitidy, konjunktivitidy).

Sérologická diagnostika infekcí EBV

Spektrum dostupných diagnostických metod zahrnuje jednak nespecifické testy pro detekci heterofilních protilátek (Paul Bunnell, Ericson, Davidsohn) a jednak testy pro detekci specifických protilátek. Heterofilní protilátky jsou nespecifické polyvalentní protilátky, které

jsou produkovány v důsledku masivní aktivace B-lymfocytů, která provází infekční mononukleózu, nejsou však specifické pouze pro IM. Jsou pozitivní asi u 80 % pacientů s infekční mononukleózou, u dětí do 10 let však méně než v 50 %. Z toho důvodu je tato diagnostika u dětí nevhodná a v řadě laboratoří se od ní ustupuje ve prospěch stanovení specifických anti-EBV protilátek metodami NIF, ELISA nebo Imunoblot.

Jednotlivé EBV antigeny a specifické protilátky se objevují postupně v různých fázích infekce. Na základě stanovení protilátek proti těmto antigenům lze s vysokou přesností určit fázi infekce EBV. Nejdůležitější antigeny z hlediska laboratorní diagnostiky jsou antigeny VCA (virový kapsidový antigen strukturální antigen přítomný v průběhu lytické fáze infekce), EBNA-1 (nukleární antigen - produkován v jádru všech latentně infikovaných buněk) a EA (časný antigen nestrukturální protein produkováný infikovanými buňkami na začátku lytické fáze). Časný antigen má 2 složky: EA-D (difúzní), přítomen v jádru i v cytoplasmě buňky využíván v diagnostických testech a EA-R, který je pouze v cytoplasmě.

V diagnostice EBV infekce je běžně dostupné stanovení celkem 8 parametrů: protilátky anti-VCA IgG, IgM, IgA a avidita IgG, anti-EBNA-1 IgG a IgM, anti-EA-D IgG a IgM. Pro rutinní diagnostiku však zpravidla stačí 4-5 parametrů, nejčastěji jsou využívány anti-VCA IgM, IgG, případně avidita IgG, anti-EBNA-1 IgG a IgM. Ostatní parametry jsou vyhrazeny pro případy s atypickou protilátkovou odpovědí, pro případy reaktivace, chronické EBV infekce nebo pro osoby s poruchami imunity. V těchto případech lze s výhodou využít i přímé diagnostiky EBV metodou RT-PCR.

Na začátku primoinfekce (4.-7. den) se zpravidla objevují protilátky anti-VCA ve třídě IgM a takřka současně i IgG. Protilátky IgG anti-VCA mají v prvních 4-6 týdnech po primoinfekci nízký index avidity (do 40 %). Protilátky IgM anti-VCA přetrvávají 2-4 měsíce, poté vymizí a doživotně jsou přítomny jen protilátky IgG. Přibližně 10 % pacientů však netvoří při primoinfekci anti-VCA IgM nebo se IgM objevují později než IgG. Naopak u některých pacientů se IgM anti-VCA tvoří ještě i 6-8 měsíců po primoinfekci, IgM mohou být přítomny i při reaktivaci nebo v důsledku polyklonální stimulace B-buněk v důsledku jiné probíhající infekce. V těchto případech je pro rozlišení primoinfekce obzvláště důležité stanovení avidity IgG anti-VCA.

	základní parametry					doplňkové parametry		
	EBNA-1 IgM	EBNA-1 IgG	VCA IgM	VCA IgG	VCA avidita IgG	VCA IgA	EA-D IgM	EA-D IgG
Séronegativní	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Primární EBV infekce	neg./poz.	neg. (poz.)	poz.(neg.)	poz.	nízká	poz. (neg.)	poz. (neg.)	poz. (neg.)
Latentní infekce	neg.	poz. (neg.)	neg. (poz.)	poz.	vysoká	neg.	neg.	neg. (poz.)
Reaktivace infekce	neg./poz.	poz. (neg.)	poz.(neg.)	poz.	vysoká	poz.	poz./neg.	poz.
Chronická aktiv. infekce	neg.(poz.)	neg./poz.	poz./neg.	poz.	vysoká	poz./neg.	poz./neg.	poz.

Vysvětlivky: neg./poz. nebo poz./neg. – obě varianty jsou možné, první je častější, druhá méně častá
neg. (poz.) nebo poz. (neg.) – obvyklá je první varianta, varianta v závorce se vyskytuje vzácně

Tabulka č.1 - Interpretace sérologických nálezů u EBV

Protilátky anti-EBNA-1 se objevují zpravidla až za 3-6 měsíců po primoinfekci, nejprve IgM a později IgG. IgM postupně vymizí, zatímco IgG anti-EBNA-1 přetrvávají celoživotně. Přibližně 10 % osob však nikdy protilátky proti nukleárnímu antigenu nevytvoří. Naopak v některých případech se mohou anti-EBNA protilátky objevit dříve, někdy i před vymizením anti-VCA IgM při primoinfekci. V těchto případech je interpretace sérologických nálezů obtížná a pomáhá stanovení dalších markerů, zejména avidity IgG anti-VCA, anti-EA IgG a anti-VCA IgA.

Protilátky anti-EA se objevují na začátku primoinfekce u 50-70 % pacientů a vymizí v průběhu 2-4 měsíců. Vysoké hodnoty anti-EA IgG jsou detekovány zejména u reaktivace EBV infekce, u chronické infekce a u některých maligních onemocnění navozených EBV. Pro reaktivace a chronické stavy jsou charakteristické také silně pozitivní anti-VCA IgA, které se objevují i v časně fázi primoinfekce.

Přímá diagnostika infekcí EBV

Pro přímou diagnostiku EBV se v dnešní době využívá v laboratorní praxi nejčastěji metody RT-PCR pro kvantitativní stanovení virové DNA. Tato metodika je vyhrazena pro případy, kdy na základě sérologického vyšetření nelze jednoznačně stanovit diagnózu, je pomocnou metodou v případech chronické aktivní infekce a lymfoproliferativních stavů u imunosuprimovaných osob, kdy stanovujeme virovou nálož v tělesných tekutinách nebo v biotických vzorcích.

Přímý průkaz virové DNA v likvoru je metodou volby u neuroinfekcí, současně je vhodné vždy porovnat

virovou nálož v krvi vzhledem k možné kontaminaci likvoru krví při odběru vzorku. V indikovaných případech lze vyšetřit metodou PCR i jiný materiál, např. stěr z oka či sklívec u očních infekcí.

Závěr

Volba vhodných diagnostických metod a následná interpretace výsledků závisí na anamnéze, klinickém stavu pacienta i na výsledcích ostatních laboratorních vyšetření. Nesprávný odběr materiálu, nevhodné skladovací či transportní podmínky bývají příčinou nesprávných a mnohdy i zavádějících výsledků. Proto při jakýchkoliv pochybnostech je vhodné odběr materiálu, výběr diagnostických metod a interpretaci výsledků konzultovat s pracovníky laboratoře.

Literatura:

1. Hess R.D. Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(8): 3381-3387
2. Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in humans. *Int J Hematol.* 2000; 71(2): 108-117
3. Roubalová K. Laboratorní diagnostika herpetických virů. *Medicina pro praxi* 2010; 7(5): 241-244
4. Roubalová K., Roubal J., Skopový P., Fučíková T., Domorázková E., Vonka V. Antibody response to Epstein-Barr virus antigens in patients with chronic viral infection. *J Med Virol* 1998; 25(1): 115-122
5. Roubalová K., Horáček J., Němeček V., Otavová M. et al. Doporučené metody ve virologické diagnostice. *Acta hygien epidemiol mikrobiol* 2000; 1: 7-12, 23-28, 53-55
6. Berger C., Day P., Meier G., Zingg W et al. Dynamics of Epstein-Barr virus DNA levels in serum during EBV-associated disease. *J Med Virol* 2001; 64: 505-512

Význam rychlých metabolických vyšetřovacích metod pro záchyt mykobakterií z klinických vzorků

Jiřina Stolaříková, Vít Ulmann, Dagmar Štěrbíková

Laboratoř pro diagnostiku mykobakterií

Tuberkulóza představuje významný problém světového zdravotnictví a je jednou z hlavních příčin úmrtí na infekční choroby ve světě. Dle WHO se odhadovalo v roce 2009 asi 9,4 mil. nemocných na tuberkulózu, na toto onemocnění umírá asi 2 mil. lidí ročně. Přibýlo rovněž případů netuberkulózních mykobakteriálních infekcí a navíc došlo ke zvýšení výskytu multirezistentní tuberkulózy - multidrug-resistant tuberculosis - MDR-TB, (mezi země s nejvyšší incidencí MDR-TB patří Čína, Indie, Ruská federace, jižní Afrika)^{4,5}.

Kultivace, identifikace a oznámení pozitivních výsledků trvá laboratořím relativně dlouho, což je způsobeno tím, že generační doba mykobakterií je ve srovnání s většinou jiných mikroorganismů podstatně delší, což ovlivňuje růstové podmínky a délku kultivační doby. Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) doporučila vynaložit maximální úsilí, aby laboratoře mohly využívat nejrychlejší metody, které jsou v rámci diagnostiky mykobakterií dostupné. Vedle standardního mikroskopického a klasického kultivačního vyšetření se doporučuje použít rychlou metabolickou kultivační metodu^{1,2,3,9}. Zkumavky pro záchyt mykobakterií MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube fy Becton



Obrázek č.1 - Pozitivní kultivace mykobakterií metodou MGIT (hrudkovité kolonie na dně zkumavky)

Dickinson) obsahující pozměněné živné médium Middlebrook 7H9 s přidávkou živných látek a antibiotickou směsí, jsou jedním z nejužívanějších tekutých médií pro rychlou kultivaci mykobakterií.^{1,2,3,9} Rovněž naše laboratoř má s tímto vyšetřením velice dobré zkušenosti (viz. níže).

Všechny typy klinických vzorků (pulmonární i extrapulmonární, s výjimkou krve a moči), lze ve zkumavce MGIT kultivovat. Vyšetřovaný vzorek je inokulován do zkumavky MGIT, kultivován a průběžně

Tabulka č. 1 - Výsledky vyšetření rychlou kultivační metodou MGIT v porovnání s klasickou kultivační metodou za rok 2008, 2009 a 2010.

	MGIT + Kultivace +	MGIT + Kultivace -	MGIT - Kultivace +	MGIT + Kont. kultivace	Kont. MGIT Kultivace +
2008	102	33 (6)*	87 (42)**	23 (1)*	5 (2)**
2009	110	60 (40)*	46 (27)**	7 (4)*	7 (4)**
2010	98	67 (58)*	34 (15)**	14 (12)*	0 (0)**
CELKEM	310	160 (104)*	167 (84)**	44 (17)*	12 (6)**

* čísla uvedená v závorce uvádějí počty zachycených kmenů *M.xenopi*
 ** čísla uvedená v závorce uvádějí počty zachycených kmenů *M.gordonae*
 Kont. = kontaminace

Tabulka č. 2 - Srovnání výsledků vyšetření rychlou kultivační metodou MGIT a klasické kultivace u pozitivních nálezů za období 2008-2010.

	MGIT + Kultivace +	MGIT + Kultivace -	MGIT - Kultivace +	MGIT + Kont. kultivace	Kont. MGIT Kultivace +
<i>M.tuberculosis</i>	122	11	13	7	0
<i>M.kansasii</i>	47	5	7	5	1
MAIC	50	7	7	4	2
<i>M.fortuitum</i>	10	6	8	2	0
<i>M.chelonae</i>	7	0	7	0	0
<i>M.xenopi</i>	26	104	22	17	1
<i>M.gordonae</i>	8	3	84	1	6

• MAIC = *Mycobacterium avium-intracellulare* complex
 • V tabulce jsou uváděny počty jen nejčastěji se vyskytujících mykobakterií, ojedinělé nálezy méně běžných mykobakterií nejsou v tabulce uvedeny, jelikož pro malé počty nelze provést validní hodnocení.

odečítán až do získání pozitivního výsledku nebo do ukončení kultivace (42 dní).

Zkumavky, které jsou vybrány s podezřením na pozitivní nález mykobakterií, jsou vyšetřeny mikroskopicky na přítomnost acidorezistentních tyčinek. Pozitivní výsledky jsou hlášeny jako předběžný výsledek ošetřujícímu lékaři.

Vyšetření prováděná rychlou metabolickou metodou jsou doplňková vyšetření a musí vždy probíhat zároveň s mikroskopickým vyšetřením a inokulací alespoň dvou vaječných pūd a následnou kultivací po dobu 9 týdnů⁶.

Vyšetření metodou MGIT manual bylo zahájeno na našem oddělení v roce 2001. Výhodou vyšetření je možnost použití i pro silně kontaminované vzorky nespecifickou bakteriální flórou, kterou se nepodařilo při dekontaminaci dostatečně eliminovat (viz. tabulky). Také vzhledem k automatickým systémům má manuální odečítání své výhody. Je možno sledovat dynamiku fluorescence u jednotlivých vzorků a udělat mikroskopické vyšetření u podezřelých vzorků, které mají nižší hodnotu než je pozitivní (pozitivita je dána mezní hodnotou 13 na stupnici odečítacího zařízení, která signalizuje přítomnost cca 104-107 životaschopných mykobakteriálních jedinců v 1 ml média - CFU/ml), automatické systémy toto nezachytí (časté např. u *M. xenopi* - viz. tab. č. 2)³. Je zde možnost věnovat zvýšenou pozornost pacientům s nálezem mykobakteriálních kmenů již v minulosti, pacientům s pozitivní mikroskopií, popř. konzultovaným pacientům. Kapacita vyšetření není omezena. Nevýhodou je vyšší časová náročnost kladená na odečítajícího pracovníka⁹.

Některí vzácnější (méně běžní) zástupci rodu *Mycobacterium*, ale i subspecie běžných druhů mykobakterií, nemusí být díky svým kultivačním nárokům a nižší odolnosti vůči dekontaminačním činidlům při použití standardních postupů v klinickém vzorku detekováni.

Za pozornost stojí údaje o výtěžnosti izolací *M. xenopi* metodou MGIT, které je pomalu rostoucí podmíněně patogenním mykobakteriem, schopným vyvolat onemocnění člověka s plicní i mimo plicní lokalizací^{7,8}. Kmen má vyšší růstové nároky, tudíž se mu více daří v obohaceném kultivačním médiu MGIT, rovněž je to dáno



Obrázek č. 2 - Immunoblot pro diagnostiku neuroborreliózy f. Euroimmun

charakterem jeho růstu (v roztroušených drobných hrudkovitých koloniích), které zachytí oko zkušeného pracovníka, nikoliv automatický systém (viz. tabulky)³.

U kmenů *M. gordonae* je naše zkušenost odlišná ve prospěch kultivační metody (viz. tabulky).

Kmen má nižší kultivační nároky, stejně jako *M. xenopi* se běžně nachází ve vodovodních systémech, na rozdíl od *M. xenopi* se nepovažuje za patogenní ani podmíněně patogenní mikroorganismus. Na kultivačních pūdách se nachází většinou v ojedinělých koloniích a je považováno za kontaminaci.

Rychlá metabolická kultivační metoda MGIT především významně urychluje dobu záhytu mykobakterií vzhledem ke klasické kultivaci. Např. u kmene *M. tuberculosis* je to v průměru o 12 dní, u pomalu rostoucích mykobakterií *M. avium* až o 18 dní a u *M. intracellulare* o 16 dní¹⁰.

Při nálezů acidorezistentních tyčinek ve zkumavce MGIT je hodnocen zároveň nález na klasických kultivačních pūdách, v řadě případů je tedy i pozitivní kultivační výsledek zjištěn dříve než při rutinním odečítání kultivačního vyšetření.

Výsledky kultivace z naší laboratoře i ze zahraničí potvrzují, že MGIT je rychlá, citlivá a spolehlivá kultivační metoda pro záchyt mykobakterií ze sput i jiných klinických vzorků, ve světě považována za „zlatý standard“^{1,2,3,9}.

Na základě naší dlouholeté zkušenosti při využívání této metody a také přijatelným nákladům na vyšetření, doporučuje MGIT jako vhodný doplněk ke klasické kultivaci u všech druhů materiálů odebíraných pacientům s podezřením na tuberkulózu a mykobakteriózu. V případě opakovaných odběrů sputa v průběhu týdne, je vhodné alespoň u jednoho až dvou vzorků ze série toto vyšetření doplnit.

Literatura:

1. Tortoli E., Cichero P., Piersimoni C., Simonetti M.T., Gesu G., Nista D.: Use of BACTEC MGIT 960 for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens: Multicenter Study, J. Clin. Microbiol., Vol. 37, No. 11, Nov. 1999, p. 35783582
2. Heifets L., Linder T., Sanchez T., Spencer D., Brennan J.: Two Liquid Medium Systems, Mycobacteria Growth Indicator Tube and MB Redox Tube, for Mycobacterium tuberculosis Isolation from Sputum Specimen, J. Clin. Microbiol., Vol. 38, No. 3, Mar. 2000, p. 12271230
3. Piersimoni C., Nista D., Bornigia S., Gherardi G.: Unreliable Detection of Mycobacterium xenopi by the Nonradiometric Bactec MGIT 960 Culture System, J. Clin. Microbiol., Vol. 47, No. 3, Mar. 2009, p. 804806

4. Homolka, J.: Tuberkulóza dosud nevyřešený problém, Stud. Pneumol. Phthisiol. 5, 183, 2006.
5. World Health Organization 2010. WHO Report 2010, Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing. Geneva.
6. Kolektiv autorů. Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí. Vydala Národní referenční laboratoř pro mykobakterie SZÚ Praha, ve spolupráci s firmou TRIOS s.r.o., Praha, říjen 1998
7. Kaustová J., Tunysová V.: Častý průkaz kmenů Mycobacterium xenopi ve vzorcích odebraných u obyvatel jednoho městského obvodu Ostravy, Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 1998(4);302-305

8. Coombes G. M., Teh L. S., Denton J., Johnson A. S., Jones A. K. P.: Mycobacterium xenopi-an unusual relation as tenosynovitis of the wrist in an immunocompetent patient, British Journal of Rheumatology 1996; 35:1008-1010
9. Cruciani M., Scarparo C., Malena M., Bosco O., Serpelloni G., and Mengoli C., Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria, J. Clin. Microbiol., May 2004; 42: 2321-2325
10. Kirihara J. M., Hillier S. L., and Coyle M. B.: Improved detection times for Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis with the BACTEC radiometric system, J. Clin. Microbiol., Nov 1985; 22: 841-845.

Vyšetření protilátek proti vlasovým folikulům u alopecia areata

Jana Motlochová

Oddělení imunologie a alergologie

Alopecie je onemocnění charakterizované vypadáváním vlasů, kdy dochází k poruchám vlasového růstu.

Příčina vypadávání vlasů může být jednak vnější (exogenní) způsobená chemickými (trvalá, barvení), mechanickými (různé účesy) a fyzikálními vlivy nebo vnitřní (endogenní) jako důsledek nemocí, špatné výživy, vypadávání vlasů podmíněné medikamentózně, přirozené ztráty vlasů, po těhotenství, genetické podmíněnosti.

V závislosti na příčině poruchy růstu vlasů lze alopecii klasifikovat do několika skupin (ložisková/difuzní, lokalizovaná/totální, jizvící/nejizvící).

Jizvící alopecie - patří sem např. alopecie atrophicans a celá škála onemocnění končících jizvou. Podstatou jizvících alopecií je zánik vlasového folikulu (např. následkem bakteriálních zánětů nebo virových infekcí.)

Nejizvící alopecie je reverzibilní a je nadějí na úplné vyléčení. Patří sem např. alopecie areata a alopecie traumatica.

Alopecia areata (AA) je nejizvící alopecie, typická náhlým vznikem ostře ohraničených okrouhlých nebo oválných ložisek, s nezměněnou kůží. Ložisko je obvykle ojedinělé nebo jich vzniká několik současně. Ačkoli onemocnění není životu nebezpečné, může vést k psychickým poruchám jedince, až k neakceptování sebe sama a vyloučení sebe sama ze společnosti. Počátek onemocnění se objevuje nejčastěji v dětském až mladistvém věku, ale může se projevit i v dospělosti. Často bývá doprovázeno astmatem, sennou rýmou, atopickým ekzémem, onemocněním žláz s vnitřní sekrecí a s jinými nemocemi s autoimunitním podkladem. Pacient přichází k lékaři na dermatologii v době, kdy postřehne alopatrická ložiska. Ve skutečnosti však toto onemocnění začíná dřív (1). Pacient v anamnéze většinou udává, že bezprostředně před objevením se alopatrických ložisek prošel silným psychickým stresem (např. ztráta zaměstnání, úmrtí blízké osoby). Pokud se na tento typ alopecie nereaguje léčbou, její další vývoj může vést k úplné plešatosti (A. totalis) nebo ke ztrátě vlasů a chlupů po celém těle (A. universalis). Přesná patofyziologie onemocnění je pořád neznámá. Vedle genetických příčin to mohou být příčiny nervového či psychického původu, velká váha se připisuje příčinám imunologickým. Lze si také povšimnout, že mnohdy současně probíhá další autoimunitní onemocnění (systémový lupus erythematosus (SLE), diabetes mellitus (DM), tyreoiditida aj.). Krokem vpřed ve výzkumu

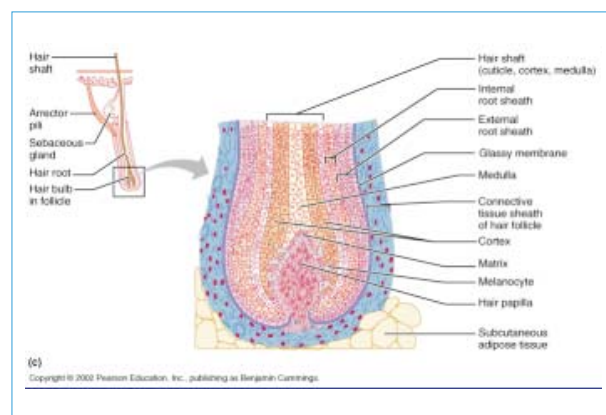
patofyziologie onemocnění bylo zjištěno, že se u AA, stejně jako u jiných autoimunitních onemocnění, vyskytují autoprotilátky.

Patofyziologie AA

Vypadávání vlasů souvisí se změnami v růstovém cyklu vlasu. Tkáňová biopsie z postiženého místa AA ukazuje normální počet folikulů, ale většina z nich jsou v telogenní nebo katagenní fázi.

Vlasový folikul je poškozen v časně anagenní (růstové) fázi. U nemocných nacházíme často vysoký titr protilátek IgG proti antigenům strukturám vlasového folikulu (2).

Nejběžnějšími antigeny u AA jsou struktury vnitřní a vnější kořenové pochvy, matrix, všechny antigenní struktury na keratinocytech (Auberova matrix), precortex a cortex (viz obr. 1).



Obrázek č.1 - Struktura vlasu

Autoprotilátky proti těmto antigenům, mimo jiné faktory, mají na svědomí zastavení růstu vlasů. Velký význam má i lymfocytární infiltrát kolem i ve vlasovém folikulu v anagenní fázi (3). V infiltrátu jsou to především lymfocyty CD4+ kolem folikulu, CD8+ intrafolikulárně, v menší míře Langerhansovy buňky.

Určité množství imunokompetentních buněk se nachází i u fyziologického folikulu, avšak ne v tak velké míře jako u AA. Z výše uvedeného vyplývá, že kolem vlasu v jeho anagenní fázi je určitá imunologická rovnováha, jejíž narušení vede k autoagresivním pochodům. To vysvětluje, že AA je považována za autoimunitní onemocnění s účastí buněčné i humorální imunity.

Metody detekce protilátek proti vlasovým folikulům

Nepřímá imunofluoresce (4)

Většinou se jako substrát používá lidský zdravý skalp (udává se 7μm silný/tlustý) a fluoresceinem značený konjugát. Preparáty se odečítají ve fluorescenčním mikroskopu a hodnotí se intenzita fluorescence od negativní až po silně pozitivní.

Experimentálně bylo provedeno stanovení autoprotilátek proti strukturám vlasového folikulu ve skupině nemocných s AA a ve skupině zdravých jedinců, kteří sloužili jako kontrola (4). Bylo zjištěno, že autoprotilátky se vyskytují v obou skupinách, avšak protilátková odpověď u kontrolní skupiny byla jen ve 30 % a titer protilátek byl nízký. Pozitivita antigenních struktur byla různorodá (vnější, vnitřní kořenová pochva, matrix, pre-cortex, keratogenní zóna, folikulární papila).

Western Blot (2,4)

Antigeny jsou připravovány ze zdravého lidského skalpu. Pacienti s AA vykazují vysokou reaktivitu proti těmto skupinám antigenů: 44-46 kDa (exprese na keratinocytech vlasových folikulů v prekortikální zóně), 60-75 kDa, 90-120 kDa, 200-220 kDa (trichohyalin ve vnitřní kořenové pochvě).

Léčba AA je velice obtížná a odevza individuální. Podávají se imunosupresiva, místně se používá kryoterapie, fototerapie s aplikací psoralenů před ozářením, imunostimulační látky (5).

Nejlepší výsledky přináší difenylocyklopropenon (DCP).

Při výzkumu účinnosti léčby DCP na obnovení růstu vlasů byly pacientům vyšetřeny protilátky proti vlasovým folikulům před léčbou, v průběhu léčby a po léčbě. Pacienti před léčbou vykazovali protilátky proti nižším vrstvám vlasového folikulu, zejména proti keratinocytům a vnitřní kořenové pochvě. Za 3 - 9 měsíců léčby byly pozorovány na kůži chloupky a titer protilátek byl zatím stejný, v některých případech byl i vyšší než tomu bylo před léčbou. Protilátky byly naměřeny především proti vnitřní kořenové pochvě. Při dalším pokračování v léčbě se začal titer protilátek u některých pacientů snižovat. Po kompletní léčbě, při nárůstu trvalých vlasů, u všech pacientů došlo k poklesu koncentrace (titru) protilátek. U některých přetrvával nízký titer.

Porovnává-li se dynamika změn koncentrací protilátek před léčbou, v průběhu léčby a po léčbě stanovených metodou nepřímé imunofluorescence se stanovením Western Blotem, lze říct, že pohyb

koncentrace protilátek je obdobný. Po kompletní léčbě i u WB byly pozorovány slabé pásy v oblasti 47, 50, 57 kDa(4).

Naše laboratoř prováděla stanovení protilátek proti vlasovým folikulům metodou nepřímé imunofluorescence na substrátech opičí kůže dodávaných firmou Binding Site (Money Hair Follicle, kat.čís. CUS2176, Binding Site Ltd.). Jako konjugát byl používán anti-Human IgG (H+L) Monkey Adsorbed AFF FITC rovněž od firmy Binding Site Ltd. Vyšetření bylo prováděno v sérech ředěných 1:40. Tato diagnostika je dnes již nedostupná. V současné době nejsou v ČR dostupná žádná komerční diagnostika pro detekci nebo stanovování protilátek proti vlasovým folikulům nebo jejich antigenům.

V období únor 2009 až prosinec 2010 bylo vyšetřeno 108 pacientů, z toho 83 žen a 25 mužů. Pozitivní protilátky proti vlasovým folikulům byly nalezeny u 8 pacientů s diagnózou alopecia areata, alopecia universalis a 5 pacientů s různými diagnózami, a to především týkajícími se štítné žlázy.

Sledování pacienti byli většinou léčeni kortikoidy v kombinaci s cyklosporinem, kdy došlo k částečnému nebo úplnému nárůstu vlasů. Zajímavým poznatkem z praxe je, že tato kombinovaná léčba alopetických pacientů je úspěšná jak pro pacienty, u kterých byly prokázány protilátky proti vlasovým folikulům, tak u pacientů s negativním nálezem těchto protilátek.

Z výše uvedeného se nabízí otázka: Má vyšetřování protilátek proti vlasovým folikulům klinický význam? Podle doporučení odborníků na diagnostiku a léčbu AA by se měl více provádět histologický rozbor kůže, v jehož rámci by se mělo zjišťovat, zda kolem vlasového folikulu, pokud je vůbec přítomen, je infiltrace T lymfocytů. V případě zjištění takovéto infiltrace je na místě zahájit léčbu. V opačném případě, tzn. nepřítomnosti folikulů, výše uvedená léčba nemá význam.

Literatura:

1. Misery L., Roussel H.: Is alopecia areata a psychosomatic disease? Rev Med Interne 2001; 22(3):274-9
2. Tobin D.J.: Characterization of hair follicle antigens targeted by the anti-hair follicle immune response. J Investig Dermatol Symp Proc. 2003; 8(2):176-81
3. Alexis A.F., Dudda-Subramanya R., Sinha A.A.: Alopecia areata: autoimmune basis of hair loss. European Journal of Dermatology 2004; 14(6):364-70
4. Tobin D.J., Gardner S.H., Linsey N.J., Hoffmann R., Happle R., Freyschmidt-Paul P.: Diphenylpyrone immunotherapy alter anti-hair follicle antibody status in patient with alopecia areata. European Journal of Dermatology 2002; 12(4):327-34
5. Cirmanová V., Stárka, L.: Asociace alopecia areata s autoimunitní tyreoidou u 17leté dívky. Med.Pro Praxi 2006; 6: 294-5

Nové možnosti identifikace mikroorganismů

Tereza Škapová

Laboratoř bakteriologie Ostrava

V mikrobiologické laboratoři je identifikace mikroorganismů izolovaných z klinického materiálu založena nejčastěji na identifikaci jejich fenotypových vlastností. Mezi tradiční metody identifikace mikroorganismů náleží mikroskopie, růst na selektivních nebo selektivně-diagnostických půdách a stanovení biochemických vlastností izolovaných mikroorganismů. Základ identifikace mikrobů

představují biochemické identifikační metody, kdy zjišťujeme schopnost mikroorganismů metabolizovat určité substráty. Existuje mnoho typů identifikačních testů, které se liší jak rychlostí, tak technikou provedení. Biochemický průkaz náleží v současné době stále k nejčastěji používaným metodám identifikace, je ale založen na růstu mikroorganismů a proto je relativně časově náročný.

Za alternativu klasickým způsobům identifikace by mohly být považovány molekulárně biologické metody, zejména detekce nukleových kyselin mikroorganismů metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo sekvenace 16S ribozomální RNA. Tyto metody jsou ovšem stále finančně náročné a pro rutinní identifikaci mikroorganismů z většiny vzorků klinického materiálu nejsou vhodné.

V posledních dvou letech proniká do klinických laboratoří nový způsob identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie, která je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností. Konkrétně se jedná o metodu MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii celulózních proteinů využívající ionizaci laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight). Jsou tedy detekovány bílkoviny specifické pro daný mikroorganismus, jejichž spektrum je poté srovnáváno s širokou databází referenčních spekter (díky otevřenosti databáze teoreticky neexistuje limit metody MALDI-TOF ve schopnosti identifikace)(1,3).

Komerčně dodávané automatizované systémy MALDI-TOF jsou svou velikostí a nenáročností na speciální vybavení vhodné pro rutinní použití. Příprava vzorku pro analýzu je jednoduchá - vzorek (malá část kolonie mikroorganismu izolované na pevné kultivační půdě) je nanesen na terčík na povrchu kovové destičky. Poté je vzorek převrstven vhodnou maticí (směs organických kyselin) a po zaschnutí je připraven k analýze ve spektrometru, která probíhá zcela automaticky. Prováděné studie uvádějí úspěšnost druhové identifikace metodou MALDI-TOF v rozmezí 84,1-95,2 % (1). Největší výhodou metody je bezesporu rychlost. Výsledek identifikace metodou MALDI-TOF je znám zhruba za 5 min. od započetí analýzy (identifikace

klasickými metodami trvá 5-48 hod.). Je-li lékaři známá identifikace patogenu v takto krátké době, může optimalizovat časnou empirickou antibiotickou léčbu u pacienta.

Spektrum identifikovaných mikroorganismů zahrnuje bakterie, mykobakteria i kvasinky, probíhají studie, které se zabývají využitím MALDI-TOF k identifikaci vláknitých hub (1). Je rovněž testován potenciál metody při průkazu patogenů přímo ze vzorků klinického materiálu, zejména z hemokultur (2, 4). V budoucnu není vyloučena ani schopnost metody MALDI-TOF detekovat některé molekuly ovlivňující rezistenci bakterií k antibiotikům (1).

Možnost identifikace mikroorganismů metodou MALDI-TOF jistě významně změní systém práce v klinických laboratořích. Rychlost, jednoduchost provedení a nízké náklady na analýzu mají význam pro kliniku i pro laboratoř. Laboratoř bakteriologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě plánuje zavedení a rutinní využívání metody identifikace metodou MALDI-TOF do konce letošního roku, což, jak doufáme, povede k dalšímu zkvalitnění naší poskytovaných služeb.

Literatura:

1. Bizzini, A., G. Greub. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin. Microbiol. Infect. 16:1614-1619.
2. Ferreira, L., F. Sánchez-Juanes, M. González-Ávila, D. Cembrero-Fucinos, A. Herrero-Hernández, J. M. González-Buitrago, J. L. Muñoz-Bellido. 2010. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 48:2110-2115.
3. Lay, J. O. 2001. MALDI-TOF spectrometry of bacteria. Mass. Spectrom. Rev. 20:172-194.
4. Stevenson, L. G., S. K. Drake, P. R. Murray. 2010. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 48:444-447.

Vážení kolegové současní i budoucí,

dovolte mi, abych Vás touto cestou krátce seznámil s činností Obchodního oddělení Zdravotního ústavu. Záměrem tohoto pracoviště je maximálně vycházet vstříc přáním a konkrétním představám našich klientů. Tento cíl realizuje tým obchodníků, který zodpovědně, pečlivě a ochotně řeší veškeré požadavky. Ochota naslouchat a schopnost řešit problémové situace jsou základem pro vybudování úspěšného a stabilního vzájemného vztahu. Vysokou úroveň a kvalitu služeb, případné konzultace zajišťují odborní pracovníci laboratoří Zdravotního ústavu. Členové našeho týmu dělají vše proto, aby vzájemné vazby byly co nejpevnější. V případě jakýchkoliv otázek žádostí, prosím, neváhejte a obraťte se na nás, neboť jsme tady pro Vás. Dovolte mi krátké shrnutí hlavních činností Zdravotního ústavu:

Centrum klinických laboratoří:

Široké spektrum laboratorních vyšetření biologického materiálu v oblasti bakteriologie a mykologie, imunologie a alergologie, virologie, parazitologie a lékařské zoologie, molekulární biologie, genetické toxikologie. Přípravuje autovakcíny pro imunomodulační léčbu, zajišťuje konzultace závažných komunitních infekcí a méně obvyklých mikrobiologických nálezů, garantuje ambulantní a superkonziliární činnost v oblasti klinické imunologie a alergologie. Součástí Centra jsou rovněž dvě národní referenční laboratoře - pro arboviry a pro urogenitální trichomonózu. Centrum provádí sledování bakteriální rezistence na antibiotika v lůžkových zařízeních v rámci prevence nozokomiálních nákaz rovněž stěry z nemocničního prostředí. Vše v souladu se současnými pravidly lékařské vědy i v souladu s platnými předpisy ČR.

Zajišťujeme odborné semináře. Samozřejmostí je zajištění transportu - svoz vzorků, zajištění distribuce výsledků v papírové i elektronické podobě. Pro vyšetření urgentních vzorků zajišťuje 24-hodinovou službu.

Pracovníci Obchodního oddělení CKL:

Ing. Pavel Jurčík

tel.: 596 200 226, mobil: 731 691 568, e-mail: pavel.jurcik@zu.cz

Žaneta Kováčiková

tel.: 596 200 316, mobil: 734 510 850, e-mail: zaneta.kovacicova@zu.cz

Jiřina Kmečková

tel.: 596 344 480, mobil: 602 751 391, e-mail: jirina.kmecova@zu.cz

Hana Pavlů

tel.: 596 383 252, mobil: 602 583 971, e-mail: hana.pavlu@zu.cz

Hana Štěrliková

tel.: 596 200 138, mobil: 731 608 193, e-mail: hana.sterikova@zu.cz

Centrum hygienických laboratoří:

Komplexní služby v oblasti analýz vod, odpadů, zemin, kalů, písků, sedimentů, ovzduší, potravin, kosmetiky, hraček, materiálů pro styk s pitnou vodou a potravinami, biologických materiálů, testování sterilizátorů, vyšetření zdravotnických prostředků, měření chemických škodlivin v pracovním prostředí a měření fyzikálních faktorů v rozsahu platné legislativy.

Pracovníci Obchodního oddělení CHL:

Ing. Marie Bartoňová

tel.: 596 200 132, mobil: 724 303 844, e-mail: marie.bartonova@zu.cz

Ing. Daria Heidlerová

tel.: 596 397 290, mobil: 605 708 679, e-mail: daria.heidlerova@zu.cz

Ing. Marcela Stašková

tel.: 596 200 132, mobil: 731 691 620, e-mail: marcela.staskova@zu.cz

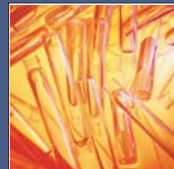
Ing. Radka Novotná

tel.: 596 200 132, mobil: 725 065 809, e-mail: radka.novotna@zu.cz

Zdeňka Zuščíková

tel.: 596 200 324, mobil: 739 247 195, e-mail: zdenka.zuscikova@zu.cz

Ing. Pavel Jurčík
vedoucí Obchodního oddělení



Elektronická distribuce laboratorních výsledků

ZÚ Ostrava nabízí **zdarma** možnost elektronické distribuce výsledků laboratorních vyšetření

Výhody elektronické distribuce výsledků

- **VÍCE RYCHLOSTI**
Lékař má výsledky laboratorního vyšetření do 1 hodiny od provedení analýzy a elektronického podepsání výsledků.
- **MÉNĚ PRACNOSTI**
Lékař má ihned přehled o výsledcích a to bez přepisování výsledků v papírové podobě a má i možnost tato data automatizovaně načíst do svého ambulantního nebo jiného informačního systému.
- **MÉNĚ CHYB**
Lékař nemusí výsledky ručně přepisovat, ale jsou automaticky načteny, vyloučena možnost chyb selháním lidského faktoru.
- **CENA - ZDARMA**
Naším zákazníkům a partnerům je tato služba poskytována bezplatně.
- **VÝSLEDKY V PAPIROVÉ FORMĚ BUDOU ZASÍLÁNY STEJNÝM ZPŮSOBEM**

Technické předpoklady

- Počítač připojený k internetu
- Informační systém (ambulantní nebo jiný), ve kterém jsou evidována data o pacientech s možností importovat výsledky laboratorních vyšetření * (není nutné, ale doporučeno).

Popis řešení a bezpečnost

- Lékař má možnost výsledky přijímat v několika standardních formátech: prostý text, DASTA1 a DASTA3. Proces distribuce výsledků je zabezpečen na bázi silného asymetrického šifrování, takže výsledky nikdy neputují po internetové síti v čitelném tvaru, ale jsou vždy bezpečně chráněny. Na serveru ZÚ Ostrava jsou všechny výsledky ke stažení vždy uloženy v šifrovaném tvaru a dešifrují se až po stažení přímo v počítači lékaře. Pro stažení výsledků k lékaři slouží aplikace "EDA klient". Podle zvoleného typu a tvaru výsledků tato aplikace umí výsledky nejenom stáhnout, ale i např. zobrazit a vytisknout. Ve většině případů však lékař tuto aplikaci využije jen k samotnému stažení výsledků za účelem následného importu do svého informačního systému. Tento informační systém však musí být pro možnost importu laboratorních výsledků nakonfigurován.
- Pro větší zdravotnická zařízení nabízíme také bezobslužnou variantu "EDA klient", která nevyžaduje zásahy uživatele. Funguje jako naplánovaná úloha, která se v nastavených časech spustí, stáhne výsledky do požadovaného umístění a ukončí se. Je proto vhodná pro nasazení kupříkladu na server, kam se výsledky centrálně ukládají.

Technickou podporu elektronické distribuce ze strany ZÚ Ostrava poskytuje:

Mgr. Jiří Ševeček

tel: 603 496 019, 596 200 181

e-mail: vysledky.ckl@zuova.cz