

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Olga Soukupová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Olga Soukupová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**NEJBĚŽNĚJŠÍ AGENS, PŮSOBÍCÍ UZLINOVÝ SYNDROM
A JEJICH LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Petra Soušková

PLZEŇ 2023

Prohlášení

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

V Plzni dne 30. 3. 2023.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Soukupová Olga

Katedra: Záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Nejběžnější agens působící uzlinový syndrom a jejich laboratorní diagnostika

Vedoucí práce: Mgr. Petra Soušková

Počet stran – číslované: 54

Počet stran – nečíslované: 17

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 32

Klíčová slova: lymfadenopatie, patogen, laboratorní diagnostika

Souhrn:

Tato bakalářská práce pojednává o nejčastějších patogenech, které vyvolávají lymfadenopatii. Teoretická část je zaměřena na charakteristiku původců chorob, klinických příznaků podstatných pro určení diagnózy a jejich vývoj v čase. Nedílnou součástí je vysvětlení cílených laboratorních vyšetření, základních terapeutických postupů a možností prevence popsaných onemocnění.

Praktická část je věnovaná laboratorním metodám, které byly použity při diagnostice příslušných infekčních agens a statistickému zpracování dat poskytnutých FN Plzeň za období 2017 až 2021. Ve výsledcích jsou uvedeny počty zachycených akutních případů jednotlivých onemocnění. Četnost onemocnění v jednotlivých letech je zachycena na výsečových grafech a následně vytvořený trend znázorňuje klesající trend počtu akutních infekcí.

Abstract

Surname and name: Soukupová Olga

Department: Department of paramedic science, medical diagnostics studies and public health

Title of thesis: The most common agents, causing nodal syndrom and their laboratory diagnostics

Consultant: Mgr. Petra Soušková

Number of pages – numbered: 54

Number of pages – unnumbered: 17

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 32

Keywords: lymphadenopathy, pathogen, laboratory diagnosis

Summary:

In this bachelor's thesis, the most common pathogens that cause lymphadenopathy are discussed. The theoretical part is focused on the characteristics of the causative agents of diseases, clinical symptoms essential for determining the diagnosis and their development over time. An integral part is the explanation of targeted laboratory examinations, basic therapeutic procedures, and the possibilities of prevention of the described diseases.

The practical part is dedicated to the laboratory methods that were used in the diagnosis of the relevant infectious agents and the statistical processing of the data provided by the FN Pilsen for the period 2017 to 2021. The results show the number of detected acute cases of individual diseases. The frequency of the disease in individual years is recorded on pie charts, and the subsequently created trend shows a decreasing trend in the number of acute infections.

Předmluva

Lymfadenopatie provází značné množství různorodých onemocnění. Z velké škály možných etiologických činitelů této patologie jsou infekce nejčastější.

Tato bakalářská práce byla napsána za účelem zmapování nejběžnějších infekčních agens způsobujících lymfadenitidu, informování o klinickém obraze, typech laboratorních metod a o základech terapeutické péče pacientů.

Cílem bakalářské práce je potvrdit nebo vyvrátit předpoklad, že výskyt akutních případů infekční mononukleózy je stabilní a nejčetnější ve srovnání s ostatními onemocněními.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Petře Souškové za vedení a odborné rady, poskytnutí materiálů a statistických dat pro vypracování praktické části bakalářské práce. Ráda bych dále poděkovala pracovnímu týmu Ústavu mikrobiologie FN Plzeň v čele s přednostou RNDr. Karlem Fajfrlíkem, Ph.D. za spolupráci a pomoc s výběrem tematické literatury.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	9
SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST	16
1 UZLINOVÝ SYNDROM. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA.....	17
2 EPSTEIN-BARROVÉ VIRUS (EBV)	19
2.1 Obecná charakteristika:.....	19
2.2 Původce:.....	19
2.3 Patogeneze:	20
2.4 Klinický obraz:	20
2.5 Laboratorní diagnostika:	23
2.6 Terapie:	24
3 TOXOPLAZMÓZA	25
3.1 Charakteristika a historie:	25
3.2 Etiologické agens a epidemiologie:	25
3.3 Patogeneze:	27
3.4 Klinické projevy:	28
3.5 Laboratorní diagnostika:	29
3.6 Terapie:	30
4 TULARÉMIE	31
4.1 Historie:	31
4.2 Charakteristika mikroorganismu:	31
4.3 Epidemiologie:.....	32
4.4 Patogeneze:	32
4.5 Klinický obraz:	33
4.6 Laboratorní diagnostika:	34
4.7 Terapie a prevence:	34
5 LISTERIÓZA	36
5.1 Úvod do historie:	36
5.2 Charakteristika mikroorganismu:	36
5.3 Epidemiologie:.....	37
5.4 Patogeneze:	38
5.5 Klinický obraz:	38

5.6	Laboratorní diagnostika:	39
5.7	Léčba a prevence:	40
PRAKTICKÁ ČÁST		41
6	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	42
6.1	Hlavní cíl.....	42
6.2	Dílčí cíl	42
7	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	43
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	44
9	METODIKA PRÁCE	45
9.1	Infekční mononukleóza.....	45
9.1.1	Stanovení heterofilních protilátek pomocí latexaglutinačního testu za využití soupravy Oxoid Infectious Mononucleosis Kit	45
9.1.2	Průkaz heterofilních protilátek pomocí Ericsonova testu (OCH) za využití diagnostika KF COMPLEMENT set.....	46
9.1.3	Stanovení protilátek proti VCA EBV ve třídě IgG a IgM a stanovení protilátek proti EAD a EAR EBV ve třídě IgG v séru metodou nepřímé imunoflorescence	47
9.1.4	Stanovení protilátek ve třídě IgG proti EBNA-1 v séru metodou EIA na analyzátoru DSX.....	49
9.2	Toxoplazmóza.....	50
9.2.1	Stanovení protilátek ve třídě IgM, IgA a IgG metodou EIA pomocí imunoenzymatické soupravy SmartEIA	50
9.2.2	Stanovení celkových protilátek proti <i>T. gondii</i> metodou komplementfixace (KFR) 52	
9.3	Tularémie	55
9.3.1	Sérologický průkaz protilátek proti <i>F. tularensis</i> metodou rychlé a pomalé aglutinace.....	55
9.4	Listerióza	57
9.4.1	Bakteriologické vyšetření krve a jiných primárně sterilních tekutin automatizovaným kultivačním systémem	57
9.4.2	Bakteriologické vyšetření likvoru mikroskopicky a kultivačně.....	58
10	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	60
10.1	Četnost vybraných onemocnění za období 2017 až 2021	60
10.2	Porovnání četností akutních infekcí vybraných onemocnění v daném roce za období 2017 až 2021	61
10.3	Trend výskytu akutních případů vybraných onemocnění za dobu 2017 až 2021	66
DISKUZE.....		67
ZÁVĚR.....		68
SEZNAM LITERATURY.....		69

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Počet vybraných akutních infekcí v roce 2017	61
Graf 2 Počet vybraných akutních infekcí v roce 2018	62
Graf 3 Počet vybraných akutních infekcí v roce 2019	63
Graf 4 Počet vybraných akutních infekcí v roce 2020	64
Graf 5 Počet vybraných akutních infekcí v roce 2021	65
Graf 6 Trend vývoje vybraných akutních infekcí.....	66

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Pacientka s okuloglandulární formou tularémie	17
Obrázek 2 Viry Epstein-Barrové pod elektronovým mikroskopem.....	19
Obrázek 3 Tachyzoiti.....	26
Obrázek 4 Tkáňová cysta obsahující <i>T. gondii</i>	27
Obrázek 5 Kolonie <i>F. tularensis</i> na čokoládovém agaru	31
Obrázek 6 Listerie v elektronovém mikroskopu	37

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Infekční příčiny generalizované lymfadenopatie 18

Tabulka 2 Četnost akutních infekcí vybraných chorob 60

SEZNAM ZKRATEK

A.....	Antigen
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALT.....	Alaninaminotransferáza
AMB	Amboceptor
AST.....	Aspartátaminotransferáza
ATB	Antibiotika
B.....	<i>Burkholderia</i>
BL	Burkittův lymfom
C.....	Komplement
CMV	Cytomegalovirus
CNS.....	Centrální nervová soustava
DNA.....	Deoxyribonukleová kyselina
DSX	DSX automatický ELISA analyzátor
EA	EBV-nukleární antigeny
EA-D.....	Early (časný) antigen difúzní složka
EA-R	Early (časný) antigen restringovaná složka
EBNA.....	EBV-nukleární antigeny
EBV	Epstein-Barrové virus
EIA.....	Enzymová imunoanalýza
ELISA	Enzyme-linked immunoassay
F	<i>Francisella</i>
FITC.....	Fluorescein izothiokyanát

HD..... Hodgkinova nemoc

HS Hemolytický systém

HIV Human Immunodeficiency Virus

HLA Hlavní histokompatibilní komplex

HSV Herpesviry

HHV-4 Human herpesvirus 4

IgA Imunoglobulin A

IgG Imunoglobulin G

IgM..... Imunoglobulin M

IgE..... Imunoglobulin E

IL-1 Interleukin 1

IM..... Infekční mononukleóza

INF- γ Interferon γ

L. *Listeria*

LEP Lidské embryonální plíce

M..... *Mycobacterium*

NK buňky..... Natural killer cell

NPC..... Nasofaryngeální karcinom

OCH..... Ox cell hemolysis

PAF Destičkový aktivační faktor

PBS Pufrovaný fyziologický roztok

PCR..... Polymerázová řetězová reakce

R..... *Rickettsia*

S. *Streptococcus*

T. *Toxoplasma*

Tc-lymfocyty Cytotoxické T-lymfocyty

TMB..... Tetramethylbenzidin – chromogenní substrát určený k detekci peroxidázové aktivity

TNF- α Tumor necrosis factor alpha

VCA..... Viral capsid antigen

VP Veronalový pufr

ÚVOD

Uzlinový syndrom představuje relativně častou pracovní diagnózu v ordinacích praktických lékařů. Zánětlivá onemocnění a nádorové procesy jsou nesporně hlavními příčinami lymfadenopatií. Zejména infekční etiologie výrazně převažuje u pacientů dětského věku a je přitom častým důvodem návštěvy pediatrů.

Správné určení diagnózy a následná odpovídající léčba vyžadují schopnost provést základní diferenciální diagnostiku, což mnohdy není jednoduché. V souvislosti s celou řadou možných příčin vývoje onemocnění diferenciálně-diagnostická rozvaha by se měla zaměřovat především na vyloučení nejčastějších etiologických činitelů, vyvolávajících uzlinový syndrom.

Ke správnému zhodnocení lymfadenopatií přispívají současné laboratorní metody, mající nejenom mimořádný diagnostický význam, ale i do určité míry ovlivňující prognózu nemocného.

TEORETICKÁ ČÁST

1 UZLINOVÝ SYNDROM. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA

Lymfadenopatie neboli uzlinový syndrom je stav, který se projevuje zvětšením mízních uzlin. Toto zvětšení se může projevit v místě proniknutí agens do organismu (v případě infekční etiologie onemocnění), nebo zvětšení uzlin pozorujeme ve dvou a více vzájemně nespojitelných částech těla. Popsané formy lymfadenopatií se nazývají lokalizovaná a generalizovaná.

Obrázek 1 Pacientka s okuloglandulární formou tularémie



Zdroj: MURRAY, Patrick, ROSENTHAL, Ken S. a PFALLER, Ken S. Medical mikrobiology 2015

Mízní uzliny jsou nedílnou součástí lymfatické soustavy, která plní bariérovou imunitní funkci, a proto je zduření uzlin je častý příznak širokého spektra infekčních chorob.

Tabulka 1 Infekční příčiny generalizované lymfadenopatie

Infekční etiologie generalizované lymfadenopatie	
Virové	EBV, CMV, HSV, adenoviry, virus zarděnek, spalniček, příušnic, HIV.
Bakteriální	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. avium intracellulare</i> , <i>Brucella spp.</i> , <i>Leptospira spp.</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Haemophilus ducreyi</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Streptobacillus moniliformis</i> , <i>Spirillum minus</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Burkholderia mallei</i> , <i>B.pseudomallei</i> , <i>Bartonella henselae</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Rickettsia conorii</i> , <i>R. tsutsugamushi</i> , <i>R. acari</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> .
Protozoární	<i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> , <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> .

Zdroj: vlastní zpracování dle knihy Obecná a klinická mikrobiologie

Uzlinový syndrom neinfekční etiologie mohou vyvolávat primární či metastatická maligní onemocnění, autoimunitní choroby pojiva (lupus, revmatoidní artritidy), alergie na některé léky (tetracykliny, sulfonamidy, hydralaziny) a další. (1)

2 EPSTEIN-BARROVÉ VIRUS (EBV)

2.1 Obecná charakteristika:

EBV byl objevený pomocí elektronového mikroskopu při pozorování virových částic z buněk tkáňových linií izolovaných z pacientů s Burkittovým lymfomem. Tento významný objev se stal v roce 1964, kdy anglický profesor Michael Anthony Epstein se svojí doktorandkou Yvonne Barrovou zveřejnili zprávu o nově detekovaných virionech nelišících od ostatních herpesvirů. (2)

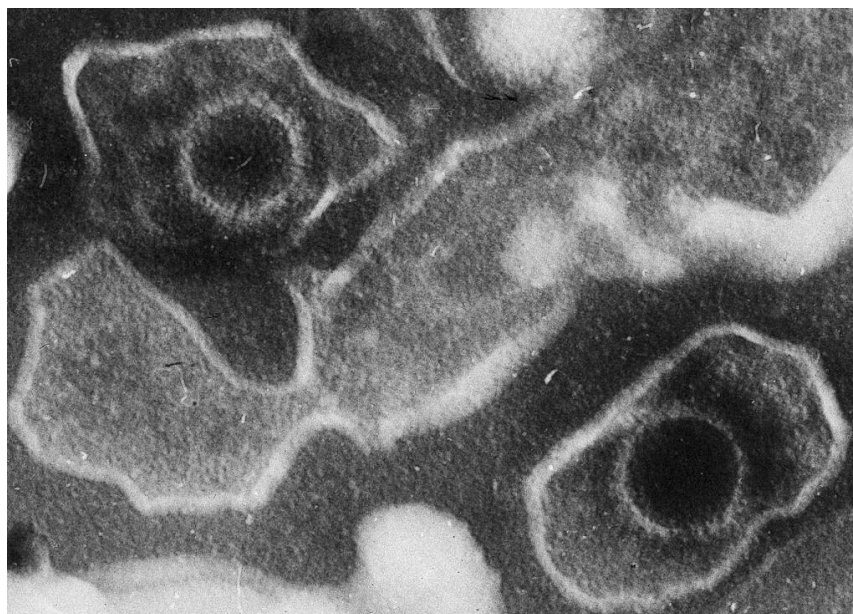
Virus Epstein-Barrové neboli lidský herpesvirus 4 (HHV-4) je jedním z nejběžnějších virů. Přibližně 95% lidské populace se setká s tímto agens a průběh onemocnění v naprosté většině případů je inaparentní.

Po prodělání primární infekce virus projevuje schopnost perzistovat v organismu: v epiteliálních buňkách nosohltanu a klidových B – lymfocytech. EBV stimuluje B-lymfocyty k proliferaci, a proto se liší od ostatních herpesvirů výrazným vztahem k maligním transformacím. (3) (4) (5)

2.2 Původce:

Virus Epstein-Barrové je herpetický virus (lidský herpesvirus 4), rodovým názvem Lymphocryptovirus, z čeledi Herpesviridae, podčeledi Gammaherpesvirinae. (6)

Obrázek 2 Viry Epstein-Barrové pod elektronovým mikroskopem



Zdroj: https://cs.wikipedia.org/wiki/Virus_Epsteina%E2%80%93Barrov%C3%A9

Je to obalený DNA virus velikosti 120-180 nm, který projevuje nízkou odolnost vůči zevnímu prostředí. Existují dva typy – EBV1 a EBV2, které se liší geny pro nukleární protein. Tento rozdíl však nenesou zásadní biologický nebo klinický význam. Pro diagnostiku jsou důležité virové antigeny, proti kterým se postupně tvoří specifické protilátky:

- EBNA (EBV-nukleární antigeny) -exprimované při latentní fázi.
- EA (early antigen) -exprimovaný během lytické fáze.
- VCA (viral capsid antigen) -strukturální proteinový komplex. (3) (6) (5)

EBV virus vykazuje schopnost dvou fází životního cyklu. 1. fáze – produktivní (lytická) v jednom typu buněk-epiteliálních buňkách nosohltanu a 2. fáze – latentní infekce v jiném typu buněk– v B-lymfocytech. (4)

2.3 Patogeneze:

Cílovými buňkami pro EBV jsou B-lymfocyty, do kterých virus vstupuje prostřednictvím CD 21 (komplementový receptor 2). Infikované B-lymfocyty stimulují imunitní odpověď, na které se nejvíce podílejí cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky. Proliferace a diferenciací Tc-lymfocytů se stimuluje po rozeznání části virových bílkovin a vede k ničení infikované buňky hostitele. Odstranění viru z organismu tak souvisí s poškozením infikovaných buněk, což může mít ještě větší patologický efekt než přímý cytolytický efekt viru.

V počáteční fázi virová infekce působí jako aktivátor B-buněk a stimuluje je k sekreci různých nespecifických protilátek, které se nazývají heterofilní protilátky. Některé z těchto protilátek reagují s beraními, hovězími a koňskými červenými krvinkami, což můžeme využít při průkazu v Paul-Bunellově reakci.

Virus EBV se začleňuje po infekci do hostitelského genomu, kde perzistuje v klidových paměťových B-lymfocytech. Toto latentní stadium může trvat léta. Za různých okolností, například u imunodeficientních jedinců, dochází k reaktivaci. Při aktivaci viru dochází v určitých případech k rozvoji maligních onemocnění (Burkittův lymfom, nasofaryngeální karcinom, Hodgkinův lymfom). (7) (5) (8)

2.4 Klinický obraz:

Nákaza EB virem se může projevovat různě. Míra závažnosti infekce je dána infekční dávkou, obranyschopností a věkem hostitele.

Inkubační doba není přesně známá, probíhá 30-50 dní, občas i déle. (9)

Onemocnění vzniká při kontaktu s nemocným jedincem, zdravým nosičem viru anebo s osobou, která má inaparentní formu průběhu. Děti se mohou nakazit virem v raném věku při pití nápojů v mateřských školách ze společných slinami kontaminovaných kelímků. V dětském věku je průběh nákazy často asymptomatický. Co se týká jedinců v období adolescence a časně dospělosti (15-20 let), tak u nich vzniká typický obraz infekční mononukleózy. Kolem 90 % dospělé evropské populace má určitou hladinu protilátek vůči EBV v důsledku postupného promořování obyvatelstva od nejútlejšího věku.

Klasická manifestace primoinfekce EBV je charakterizována triádou příznaků: lymfadenopatií, splenomegalií nebo hepatosplenomegalií, exsudativní faryngitidou, doprovázenou vysokou horečkou, malátností. (3) (10) (9) (2)

Ke zduření mízních uzlin dochází nejčastěji pod úhlem čelisti a submandibulárně, podél musculus sternocleidomastoideus a v nadklíčkové oblasti. Onemocnění se může však projevit i generalizovanou formou. Postižené uzliny nehnisají, s okolím nesrůstají, jsou volně pohyblivé, bývají bolestivé. (1)

Může se objevit vyrážka nejrůznějšího charakteru, zvláště po léčbě Ampicilinem (imunopatologické uplatnění autoprotiátek). Ampicilinová řada ATB u infekční mononukleózy je proto kontraindikací.

Mezi další objektivní příznaky nemoci patří především prosáknutí horních víček, povlaková tonzilofaryngitida, která má občas těžší průběh než bakteriální angína. Hypertrofie tonzil může být zcela extrémní a vést k obturaci hltanového vchodu. Tento stav může způsobit obtížné polykání a vzácně i komplikovat dýchání. Na měkkém patře vidáme petechiální krvácení (Honzelovo znamení) a častý je i otok víček (Bassův příznak). (9) (11)

Mnoho pacientů si stěžuje na velkou únavu, která může přetrvávat i několik týdnů. Slezina bývá zvětšená, časté je poškození jater s rozvojem ikteru.

Primární infekce EBV u části infikovaných souvisí s rozvojem hemolytické anemie, encefalitidy nebo polyradikuloneuritidy (syndromu Guillain-Barré), myokarditidy, pankreatitidy či intersticiální pneumonie.

V některých případech akutní fáze onemocnění může přejít do chronického stádia a rozvíjí se tzv. syndrom chronické infekční mononukleózy. Uvedený syndrom (primoinfekce trvá

nejméně 6 měsíců) se projevuje únavou, subfebriliemi, faryngitidami, lymfadenopatiemi, bolestmi v kloubech, alergiemi různého charakteru a intenzity. (5)

Onkogenní aktivita viru EB je spojována s určitými typy zhoubných nádorů. Burkittův lymfom, nasofaryngeální karcinom, Hodgkinův lymfom se objevují hlavně u imunosuprimovaných pacientů po transplantaci kostní dřeně, solidních orgánů, u nemocných s AIDS apod. (11)

Burkittův lymfom (BL) je non-Hodgkinův vysoce maligní lymfom, který se vyvíjí z B-lymfocytů a má tendenci se šířit mimo mízní systém, například do kostní dřeně, krve a mozkomíšního moku. Vyskytuje se endemicky v rovníkové Africe a postihuje hlavně malé děti. Nemoc je nazývána podle svého objevitele, irského lékaře Denise Burkitta, který ukázal na významnou incidenci nemoci v oblastech s vysokou teplotou a vlhkostí.

Choroba vzniká translokací protoonkogenu c-myc z chromozomu 8 na 2, 14 nebo 22 do oblasti kódující imunoglobuliny. Důsledkem je neregulovaná exprese tohoto genu a nekontrolovaná proliferace buněk. (12)

Lymfom postihuje obličejové kosti a orgány břišní dutiny. Může se objevit v tenkém střevě, což má za následek střevní obstrukci nebo krvácení.

Potvrzení vzájemného vztahu mezi rozvojem Burkittova lymfomu a infekcí EBV se projevuje mnohonásobně vyšší hladinou protilátek proti EA a VCA u pacientů ve srovnání s ostatní populací. Také ve prospěch této souvislosti svědčí přítomnost virové DNA a EBNA v maligních buňkách. Předpokládá se přímá závislost mezi výskytem BL v Africe a výskytem malárie, která stále neobjasněným způsobem negativně ovlivňuje imunologickou kontrolu latentní infekce EBV. (5)

Nasofaryngeální karcinom (NPC) je další maligní nádor kauzálně spojený s infekcí EBV. Vyskytuje se endemicky v jižní Číně, ale i jinde ve světě. Rakovinné buňky obsahují virovou DNA. Na rozdíl od Burkittova lymfomu, u kterého jsou nádorové buňky odvozeny z lymfocytů, nádorové buňky karcinomu nosohltanu jsou epiteliálního původu.

Jedním z charakteristických příznaků rozvoje NPC je vysoká hladina imunoglobulinů, zejména IgG a IgA proti EB-VCA a proti D-komponentě EA. Úspěšná léčba způsobuje snížení titru těchto imunoglobulinů, naopak jejich nárůst upozorňuje na možný relaps nebo metastázy. (5) (2)

Hodgkinova nemoc (HD) je relativně vzácné zhoubné onemocnění postihující lymfatickou tkáň. Specifické pro HD jsou Reedové-Stenbergovy buňky, původem z postgerminálních B-lymfocytů, které se vymkly regulaci buněk B-řady a nepodlehly apoptóze. (13)

Důležitou roli hraje detekce vyšších titrů protilátek k EBV-antigenům, která svědčí pro souvislost HD se skrytou, perzistující formou infekce EBV. Přibližně u 50 % pacientů jsou zaznamenávány v nádorových Reed-Sternbergových buňkách virová DNA a EBV-asociované antigeny. (5)

2.5 Laboratorní diagnostika:

Diagnostika onemocnění je založena na typické klinické symptomatice, parametrech krevního obrazu (přítomnost atypických mononukleárů, což jsou aktivované T-lymfocyty, které likvidují nakažené B-buňky), a sérologickém vyšetření (zjištění hladiny protilátek proti jednotlivým antigenům).

V akutní fázi onemocnění jsou přítomny protilátky proti antigenům virové kapsidy anti-VCA IgM a IgG. Později v průběhu onemocnění protilátky anti-VCA IgM zmizí, ale protilátky anti-VCA IgG v nízkých titrech přetrvávají celý život. Anti-EBNA IgG se objevují po šesti týdnech nákazy a jsou známkou prodělané infekce. Anti-EA IgG jsou markerem chronicity EBV nebo reaktivaci nemoci, bývají detekovatelné za 3-4 týdny po prvních symptomech a přetrvávají 2-4 měsíce.

Jednou z dalších metod nepřímého průkazu onemocnění je vyšetření heterofilních protilátek pomocí Paulovy-Bunnellovy reakce (heterofilní protilátky aglutinují beraní erytrocyty). Tato reakce musí být doplněna vysycovacími testy. Při použití novějších modifikací vysycování není potřebné. Lze využít například IM-test (shlukování koňských červených krvinek) a OCH/Ericsonův-test (hemolýza hovězích erytrocytů v přebytku komplementu). Tyto reakce mohou být v dětském věku, obzvlášť u malých dětí do 5 let, negativní a z tohoto důvodu nejsou pro diagnózu spolehlivé.

Další možnosti laboratorní diagnostiky je PCR z krve nebo z moči, kultivace viru z výplachu v nosohltanu a v krevním obraze na začátku onemocnění leukopenie, která se ale časem přeměňuje v leukocytózu. V diferenciálním krevním obraze můžeme u leukocytů pozorovat zvýšení počtu monocytů a lymfocytů.

Někteří nemocní mají zvýšenou hladinu ALT, AST, občas i bilirubin. (14) (6)

2.6 Terapie:

Doposud není známá žádná efektivní, etiologická léčba ani vakcína EBV infekce.

Všudypřítomnost viru a asymptomatický průběh vede k snadnějšímu přenosu, a tedy i vyšší transmisibilitě. Infekce však vyvolává celoživotní imunitu. Proto nejlepším prostředkem prevence infekční mononukleózy je vystavení nákaze v raném věku, protože u dětí je průběh nemoci často lehký nebo bezpříznakový. (2)

Současná léčba infekce EBV je pouze symptomatická a podpůrná. Je založena na podávání antipyretik, nosních kapek, kloktadel, vitaminů, u nemocných s poškozením jater lze indikovat hepatoprotektiva.

Pokud se při kultivaci výtěru z krku objeví patogenní bakteriální flora, můžeme zahájit léčbu pomocí antibiotik penicilinové řady, makrolidy popř. cefalosporiny. Jak už bylo výše zmíněno, ampicilinová antibiotika jsou kontraindikována kvůli možnému vzniku exantému.

Při výrazném klinickém nálezu v krku, potížích s polykáním a hrozící obstrukcí dýchacích cest lze využít krátkodobě kortikoidy.

Prognóza je většinou příznivá, je však možná delší doba rekonvalescence, která trvá obvykle 2-3 týdny. (14)

3 TOXOPLAZMÓZA

3.1 Charakteristika a historie:

Toxoplazmóza je parazitární onemocnění lidí a zvířat způsobené intracelulárně se nacházejícím prvokem *Toxoplasma gondii*. K přenosu může dojít fekálně-orální, alimentární a transplacentární cestou. U člověka tato nákaza probíhá jako vrozená nebo získaná forma. (15)

Původce byl objeven v roce 1908 v tkáních hlodavce *Ctenodactylus gundi*, který se vyskytuje v Alžírsku, Libyi, Maroku a Tunisku. Jako příčina choroby člověka byla poprvé rozpoznána v roce 1923 pražským očním lékařem Josefem Janků v chorioretinických lézích u jedenáctiměsíčního chlapce. Od té doby byla choroba nazývána jako „nemoc Janků“. V roce 1983 byla popsána mozková toxoplazmóza u nemocného s pokročilou HIV infekcí. (9) (15)

3.2 Etiologické agens a epidemiologie:

T. gondii je obligátně intracelulární kokcidie, která je řazená do kmene Apicomplexa.

Pro biologický cyklus parazita je charakteristické střídání třech stadií.

Bradyzoiti (klidové formy), kteří se nacházejí ve tkáňových cystách při skryté infekci. Mezi typické rysy tohoto stádia patří schopnost relativně dlouhého přežívání mimo organismus živého hostitele – v orgánech a ve svalovině přetrvávají při +8 až +10 °C 14 dnů, při +4 až +6 °C 24 dnů.

Tachyzoiti (vegetativní – nepohlavní forma) napadají různé buňky, rychle se množí a vyskytují se v těle během akutní infekce.

Sporozoiti (stádium pohlavního rozmnožování toxoplasmy) jsou vylučováni v oocystách konečným hostitelem. (15) (16)

Obrázek 3 Tachyzoiti



Zdroj: JÍRA, Jindřich. Lékařská protozoologie 2009

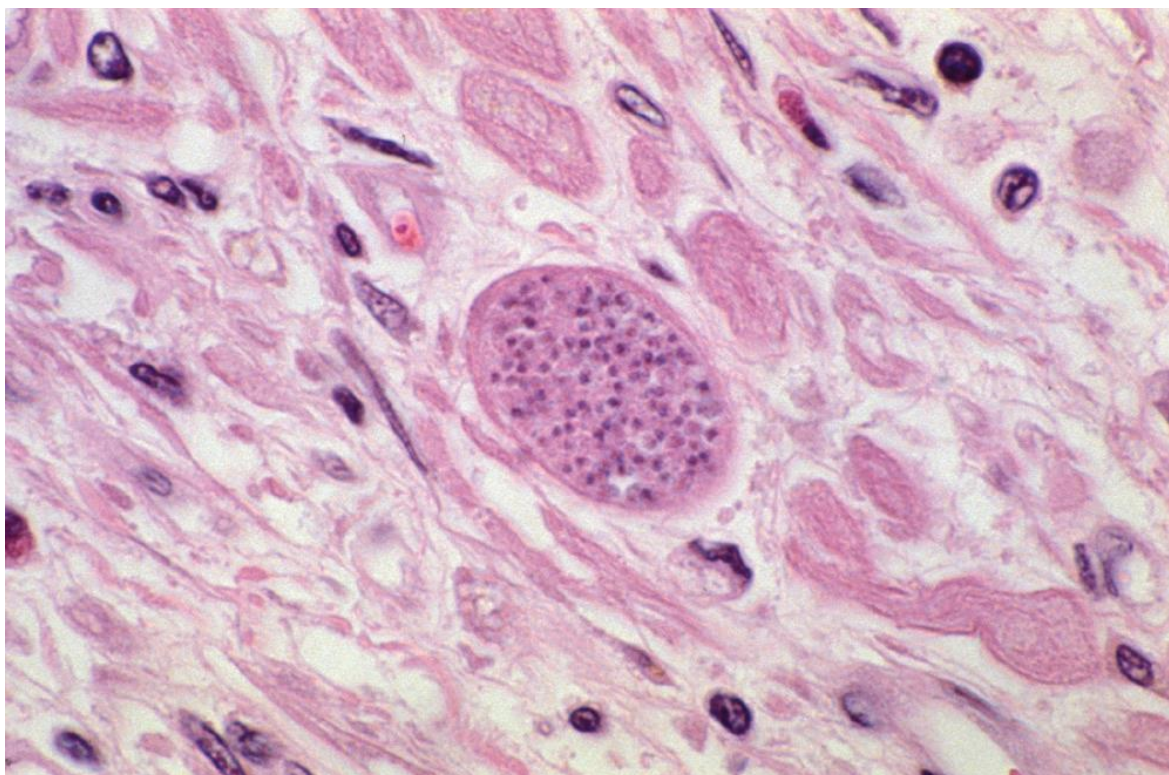
Celosvětově rozšířený parazit může infikovat asi 200 druhů savců a ptáků, ale typickým definitivním hostitelem je kočka domácí (*Felis catus*) /divoká (*Felis silvestris*). Obdobně jako i ostatní teplokrevní živočichové se může stát meziphostitelem i člověk, který je však náhodným elementem v životním cyklu cizopasníka a zpravidla tvoří slepý článek.

V tenkém střevě kočky dochází k pohlavnímu vývoji parazita, vzniká oocysta opouštějící tělo hostitele trusem. U kočky se většinou objeví střevní potíže. Ve vnějším prostředí oocysta dozrává (sporuluje), čímž získává schopnost infikovat další kočkovité šelmy nebo jiné živočichy. Po pozření vysporulovaných oocyst vzniknou u meziphostitele tkáňové cysty obsahující bradyzoity.

Tachyzoiti se nacházejí v tělních tekutinách jenom během akutního stádia, než nákaza přejde do skryté fáze. (17) (4) (16).

Člověk se pak může nakazit, pokud přijde do styku s věcmi kontaminovanými oocystami nemocných koček anebo pozřením tkáňových cyst obsažených v tepelně nedostatečně zpracované masité potravě.

Obrázek 4 Tkáňová cysta obsahující *T. gondii*



Zdroj: MURRAY, Patrick, ROSENTHAL, Ken S. a PFALLER, Ken S. Medical mikrobiology 2015

Při primoinfekci ženy v průběhu gravidity hrozí transplacentární přenos na plod s vývojem různého stupně jeho poškození. Nejrizikovější období je první trimestr.

Poměrně vzácně může být infekce přenesená nepasterizovaným mlékem, transplantací či transfuzí kontaminované krve.

Toxoplazmóza v České republice je relativně rozšířena a bývá hlášeno několik set případů nákazy ročně. Séropozitivita v populaci je vysoká, protilátky má asi 1/3-1/4 dospělého obyvatelstva. (16) (10)

3.3 Patogeneze:

Na průběh a závažnost nákazy může působit několik činitelů. Ze strany patogenu je to jeho virulence a infekční dávka, ze strany makroorganismu HLA haplotyp, pohlaví a stupeň aktivity vrozené a získané imunity.

Nespecifické imunitní mechanismy hrají důležitou roli v procesu zajištění ochrany hostitele před kokcií. Neutrofilní granulocyty, které tvoří součást vrozeného imunitního systému,

prochází cévní stěnou kapilár do poškozené tkáně. Neutrofily infikované parazitickým prvokem nemohou patogenní agens zahubit, přesto však inhibují jeho dělení. Trombocyty aktivované tachyzoity vylučují destičkový aktivační faktor (PAF), zpomalující množení cizopasníků. Živí tachyzoiti také stimulují dendritické buňky a vyvolávají v nich imunitní reakci typu Th1, doprovázenou sekrecí IL-1, INF- γ , TNF- α . Ke spouštění cytotoxických mechanismů a následné lýze parazitů jsou nezbytné NK buňky.

Specifická imunitní odpověď je založena na produkci různých tříd imunoglobulinů B-buňkami, především IgG, IgM, IgE. Slizniční IgA má významnou ochrannou funkci před proniknutím parazitů do sliznic.

Velký vliv na obranné mechanismy proti toxoplasmě mají T-lymfocyty. Jejich ochranný účinek spočívá zejména ve tvorbě IFN- γ a následné aktivaci makrofágů přímým cytotoxickým působením na tachyzoity a cytotoxickým efektem na nakažené buňky. (15) (9)

3.4 Klinické projevy:

Větší část infekcí u imunokompetentních pacientů probíhá zcela bezpříznakově a benigně. Pokud se onemocnění manifestuje, může být provázeno mírnějšími projevy. Choroba probíhá ve dvou klinických formách.

Získaná toxoplazmóza (postnatální) má různorodé klinické projevy, protože cizopasník se může vyskytovat kdekoli v organismu. Ve většině případů jsou to chřipkové příznaky: vysoká teplota, únava, bolesti hlavy, kloubů a svalů, někdy zvětšení krčních, šijových, podčelistních lymfatických uzlin.

Výjimečně se objevuje gynekologická forma, projevující se sterilitou a opakovanými potraty nebo oční forma se zánětem cévnatky, která většinou postihuje jedno oko. Komplikovaný průběh získané toxoplazmózy také může vyústit v myokarditidu nebo myositidu.

U imunokompromitovaných nemocných je vyšší incidence postižení CNS, nejčastější variantou je toxoplasmová encefalitis. Jedná se o mnohočetné ložiskové poškození v rámci obou hemisfér. Příznaky souvisí s umístěním lézí a mohou zahrnovat poruchy hybnosti končetin, hemiparézu, mentální poruchy. Reaktivace onemocnění představuje jednu z nejčastějších příčin úmrtí nemocných s AIDS. (17) (10)

Vrozená toxoplazmóza (prenatální infekce plodu) je kongenitální infekce dětí narozených matkám, které se nakazily během těhotenství. Klinické příznaky závisí na fázi gravidity, kdy

se žena infikovala *T. gondii*. Nejtěžší stupeň postižení a závažnou symptomatiku má plod v případě nákazy v rané fázi těhotenství. Pokud dojde k infekci v prvním trimestru, následkem může být spontánní potrat, narození mrtvého dítěte nebo vážné poškození plodu. Dalším charakteristickým projevem s dominancí postižení CNS a sítnice je tzv. Sabinova trias, zahrnující mozkové kalcifikace, choreoretinitidu a hydrocefalus. V případě nákazy v druhém a obzvláště ve třetím trimestru převládají nevýrazné, mírné symptomy. Tyto subklinické projevy mohou však zůstat nezpozorovány jak lékaři, tak i rodiči. U většiny případů se objeví komplikace, například chorioretinitida o rok později. (15) (17)

3.5 Laboratorní diagnostika:

V rutinní diagnostické praxi se využívá hlavně nepřímý průkaz infekčního agens, ale přímý průkaz je také možný. Za účelem detekce prvoka lze provádět biologické pokusy na zvířatech, konkrétně na albinotických myších či kuřecích embryích nebo za použití tkáňových linií.

Přímá mikroskopická identifikace parazita není běžná. Jedná se o bioptické vyšetření vzorku z excidovaných uzlin, tkáňových fragmentů orgánů apod. Součástí prenatální diagnostiky je vyšetření plodové vody prostřednictvím aminocentézy s další PCR analýzou.

Nepřímá identifikace spočívá v průkazu specifických protilátek aspoň dvěma odlišnými metodami. Jsou to komplementfixační, ELISA reakce, nepřímá imuno fluorescence. Sabinův-Feldmanův test charakteristický barevnou změnou tachyzoitu způsobenou jeho kontaktem s pozitivním sérem, se používá v současné době jen v omezené míře a na specializovaných pracovištích. (6) (15)

Při akutní infekci typicky stoupá zprvu hladina protilátek třídy IgM a IgA, postupně i IgG. Jejich hladina může zůstat vysoká relativně dlouhou dobu, což ztěžuje určení diagnózy akutní infekce gravidních žen. Řešením tohoto problému může být stanovení avidity IgG protilátek – to pomůže zjistit, jak dlouho je nemocný vystaven nákaze. Na začátku onemocnění je vazba protilátek a antigenů slabá, ale v průběhu choroby její síla stoupá.

U těžkých forem nemocí a u imunodeficientních jedinců má sérologické vyšetření pouze omezený význam. Nákazu lze diagnostikovat metodou PCR nebo histologickou vizualizací *T. gondii* v tkáních. (15) (9)

3.6 Terapie:

Léčba toxoplazmózy záleží na závažnosti onemocnění a imunokompetenci hostitele. Inaparentní a lehký akutní průběh nevyžaduje specifickou terapii, avšak generalizovaná forma s rozsevem prvoků ve vnitřních orgánech, cerebrální forma, akutní infekce těhotných a vrozená toxoplazmóza jsou indikacemi k zahájení etiologické léčby.

Kombinace pyrimetaminu a sulfadiazinu je určena jako lék první volby. Pyrimethamin inhibuje enzym, který se podílí na metabolismu folátů a může způsobit supresi kostní dřene. Proto je důležitá indikace preparátů kyseliny listové.

Klindamycin se podává při terapii oční toxoplazmózy, protože dobře proniká do patologického ložiska očních tkání.

Vzhledem k vysokému riziku vzniku malformací u plodu při nákaze parazity by se měl klást velký důraz na preventivní opatření. Těhotná žena se musí vyhýbat konzumací a manipulaci se syrovým nebo nedostatečně tepelně upraveným masem a dbát na osobní hygienu při styku s kočkou. (17) (2) (15)

4 TULARÉMIE

4.1 Historie:

Tularémie je antropozoonózní nákaza s přírodní ohniskovostí, která byla objevena v roce 1910 v Kalifornské protimorové stanici (USA). Mc'Coy a Chapin upozornili na zduření mízních uzlin u syslů, žijících v blízkosti jezera Tulare. Pokusy o izolaci patogenu byly neúspěšné, ale po usilovné práci v roce 1912 byl objeven mikrob zvaný *Bacterium tularensis*.

V roce 1914 vědci Vail, Wherry a Lamb zveřejnili článek o izolaci stejného mikroorganismu z králíků a zjistili, že je možný i přenos na člověka.

Rod *Francisella* byl pojmenován na počest Edwarda Francise, kterému se podařilo v roce 1921 izolovat etiologické agens a prokázat souvislost mezi chorobou hlodavců a člověkem. V ČR byla popsána první prokázána epidemie onemocnění v roce 1936 na Moravě. (9) (4)

4.2 Charakteristika mikroorganismu:

Francisella tularensis je intracelulární, gramnegativní, nepohyblivý a striktně aerobní kokobacil. Kultivace tohoto patogenu je velmi náročná, vyžaduje ke svému růstu cystein. Vhodné kultivační médium musí obsahovat koagulované vaječné žloutky. Růst kolonií se objeví nejdříve za 2 dny. Bakterie vytvářejí drobné a průhledné, časem mléčně zakalené kolonie. Množení agens může probíhat i ve žloutkovém vaku kuřecího embrya. (9) (8)

Obrázek 5 Kolonie *F. tularensis* na čokoládovém agaru



Zdroj: https://www.wikiskripta.eu/w/Francisella_tularensis

Virulence kmenu je vázána na pouzdro bakterie, které ji chrání před účinkem komplementu při bakteriémii. Francisela produkuje málo aktivní endotoxin, který nemá výrazný patologický vliv na lidský organismus.

Lidské nákazy vyvolávají dva druhy francisel – *F. tularensis tularensis* (typ A), který je nejvirulentnější a vyskytuje se v Severní Americe. *F. tularensis holarctica* (typ B) má mírnější průběh a vyskytuje se po celé severní polokouli. Ostatní poddruhy (*F. tularensis medi-oasiatica* a *F. tularensis novidica*) vykazují malou virulenci, a proto způsobují onemocnění u člověka jen ojedinele. (8)

4.3 Epidemiologie:

Pro chorobu je charakteristická přírodní ohniskovost, která se vyskytuje, co se týče ČR, především na jižní Moravě a v Polabí.

Zdrojem nákazy může být více než 100 druhů zvířat, zejména hlodavci (křeček, sysel, veverka, ondatra apod.) nebo zajícovité (zajíc, králík).

Přenos infekce se může uskutečnit buď přímým kontaktem se zvířaty (lov, stahování) nebo kontaminovanou potravou a vodou, méně často inhalací (při zpracování obilí, slámy) a také po přisátí klíšťaty nebo bodnutí komáry.

Inkubační doba trvá v průměru 2 až 10 dní, ale může být i delší. (9)

4.4 Patogeneze:

Jak již bylo zmíněno, patogen je vnitrobuněčným parazitem – francisely jsou fagocytovány makrofágy. Bakterie jsou schopné znemožnit fúzi fagosomu a lyzozomu, v důsledku čehož je charakteristické dlouhodobé přežívání této bakterie v makrofázích. To způsobuje chronický průběh a komplikovanou eradikaci mikroba.

Infikované makrofágy jsou zaneseny do regionálních mízních uzlin, avšak u hlodavců či imunokompromitovaných pacientů může dojít k překonání systému bariér lymfatických uzlin, jehož následkem je proniknutí do jakýchkoliv lymforetikulárních tkání. V poškozených tkáních (např. v játrech nebo ve slezině) se tvoří ložiskové nekrózy lemované granulomatózním zánětem.

Protilátková imunita, která je zprostředkována B-buňkami, je méně důležitá pro eliminaci tohoto intracelulárního agens z organismu. (9) (4)

4.5 Klinický obraz:

Počáteční symptomy nemoci mohou být nespecifické – charakteristická je celková slabost, teploty, nechutenství, bolesti hlavy a svalů, poruchy spánku. Typickým příznakem je zvětšení různých lymfatických uzlin, dokonce i mezenteriálních, které vyvolávají bolesti břicha. (18)

Tyto nespecifické projevy jsou spojené s různými formami manifestace onemocnění. Na základě cesty přenosu nákazy můžeme rozlišit řadu klinických forem, zejména:

- **Ulceroglandulární forma** je nejčastější, většinou patogen pronikne poraněnou kůží, drobnými trhlinkami ve sliznici anebo vstupní bránou může být místo přísátí klíštěte. Hlavními příznaky jsou horečka, třesavka, v místě vstupu se objeví drobné ložisko, které se postupně v průběhu několika dní přemění ve vřídek. Zároveň nastává mohutné zvětšení regionálních lymfatických uzlin, nejčastěji v podpažní či loketní jamce. Při mírném vývoji choroby lymfadenopatie trvá 2-3 týdny, pak nevyjmizí a vřídek na kůži po sobě zanechá jizvu.
- **Plicní forma** vzniká, když se mikroorganismus dostane vzdušnou cestou při zpracování obilí, slámy apod. kontaminovaných výměšky nemocných hlodavců. Je to jedna z nejzávažnějších forem tularémie. Častým klinickým projevem je bolestivý suchý kašel, při těžším vývoji může vzniknout dušnost a cyanóza. Uvedená varianta nákazy může být i následkem hematogenního rozšíření patogenu po jeho inokulaci jinou cestou.
- **Orofaryngeální a gastrointestinální forma** není až tak častá a projevuje se bolestmi v krku a zduřením podčelistních uzlin. Pacient se infikuje po požití nedostatečně tepelně upraveného kontaminovaného pokrmu, vody nebo jiných nápojů.
- **Tyfoidní forma** se rozvine jako orofaryngeální forma po konzumaci infikované potraviny, ale má obtížnější, těžší průběh a má za následek někdy i ohrožení na životě. V ČR se vyskytuje velice ojediněle, častou etiologickou příčinou je *F. tularensis* typu A. Charakteristický klinický obraz souvisí se šířením mikrobů krevním řečištěm do celého organismu a vede k sepsi spojené s poruchou funkce nebo se selháváním různých orgánů. Poměrně častá je tato forma u polymorbidních nemocných, kteří trpí bolestmi hlavy, břicha, nechutenstvím, průjmami, krvácením z trávicího ústrojí.

- **Okuloglandulární forma.** K infekci dochází zanesením patogenu do spojivkového vaku buď vetřením kontaminovanými prsty nebo při umývání kontaminovanou vodou. Onemocnění začíná otokem víček, zánětem spojivek s hnisavým výtokem a následným možným vytvářením drobných vřidků. Současně je přítomná lymfadenopatie spádových uzlin před ušním boltcem. (3)

4.6 Laboratorní diagnostika:

Pečlivě odebraná anamnéza je nezbytným základem pro určení správné diagnózy, zejména u zemědělců a chovatelů hospodářských zvířat, u kterých je pravděpodobnost přímého styku s nemocným zvířetem velká. (9)

K podezření na tularemii přispívá údaj o regionální lymfadenopatii, související s místem vstupu nákazy. Izolace patogenu z mízních uzlin, krve či sputa se podaří málokdy. Ošetřující lékař by měl před odesláním biologického materiálu předem informovat personál laboratoře, protože infekce je vysoce kontagiózní. (8) (18)

Přímý laboratorní průkaz se může opírat o kultivaci bakterií na speciálních půdách obohacených cysteinem a glukózou, koagulovaným vaječným žloutkem anebo na čokoládovém agaru. Kolonie rostou poměrně pomalu, minimálně 3 dny.

Mikroskopie tohoto agens je obtížná, podle Grama se barví málo. Detekovatelné jsou francisely pomocí metody přímé imunofluorescence, kde se dají zachytit díky navázaným specifickým protilátkám. V přímé diagnostice se také uplatňuje metoda PCR.

K potvrzení etiologie onemocnění je užitečné provést nepřímou, sérologickou identifikaci, nejčastěji je to aglutinace, mikroaglutinace, hemaglutinace nebo ELISA metoda. Nárůst titru protilátek pozorujeme až ve 3. nebo 4. týdnu od primární infekce. Významné je čtyřnásobné zvýšení titru či alespoň zaznamenání jednotlivého titru nejméně 1:80, protože protilátky po prodělané nákaze dlouhodobě přetrvávají.

Protilátky proti *F. tularensis* vykazují zkříženou reaktivitu s antigeny *Brucella abortus* a *Yersinia pestis*, což může komplikovat sérologické vyšetření. (6) (8)

4.7 Terapie a prevence:

Francisely produkují betalaktamázu zodpovědnou za rezistenci vůči penicilinům a cefalosporinům 1. a 2. generace, a proto lékem volby je kombinace aminoglykosidových a tetracyklinových antibiotik. Doxycyklin a chloramphenicol lze použít k léčbě mírných infekcí.

Alternativně můžeme použít i fluorchinolony a rifampicin, které na rozdíl od aminoglykosidů mají výhodnější farmakokinetický efekt spočívající v průniku do makrofágů.

Současně hraje podstatnou roli v úspěšné terapii její včasné zahájení. V případě kolikvace mízních uzlin je nutná chirurgická léčba – jejich incize, drenáž nebo exstirpace.

Období rekonvalescence může být pomalé a zdlouhavé. Pacienti si obvykle stěžují na únavu, poruchy spánku, pocení, bolesti hlavy a zad. (9)

Preventivní opatření zahrnují kontrolu nad přirozenými ohnisky tularemie, zejména včasnou detekci epizootií hlodavců, použití rukavic a brýlí při kontaktu s živými či uhynulými zvířaty, ochrana před bodnutí hmyzem. Včasné odstranění klíštěte také může zabránit infekci.

Prodělání choroby zanechává zpravidla dlouhodobou až celoživotní imunitu. (18) (2)

5 LISTERIÓZA

5.1 Úvod do historie:

Onemocnění poprvé popsali Murray, Webb a Swann v laboratořích Cambridgeské univerzity, kteří izolovali dosud neznámého etiologického činitele septikémie králíků a morčat. Tato grampozitivní tyčinka způsobovala změny krevního obrazu, především výraznou monocytózu, a proto byla pojmenována *Bacterium monocytogenes*.

V roce 1927 britský lékař a bakteriolog Pirie izoloval identický patogen z tkáně nemocných krys v jižní Africe a nazval jej *Listerella hepatolytica* na počest „otce antiseptické chirurgie“ Josepha Listera. Ukázalo se však, že tyto dva vyvolavatelé jsou stejní, a v roce 1940 bylo přijato rozhodnutí nazvat nově identifikovaného mikroba *Listeria monocytogenes*.

První bakteriologicky prokázáný případ lidské listeriózy byl hlášen v roce 1929 Nyfeldtem, kterému se podařilo vykultivovat listerie z krve pacientů s tonzilitidou.

V ČR byl zaznamenán zvýšený výskyt v 50. letech minulého století. (5) (9)

5.2 Charakteristika mikroorganismu:

Původcem choroby je *L. monocytogenes*, která je jediným patogenním typem z šesti druhů těchto bakterií. Jde o grampozitivní, fakultativně anaerobní drobnou tyčinku schopnou růstu v širokém teplotním rozmezí (0 až 50 °C) a ve vysokých koncentracích soli. Z toho vyplývá, že listerie jsou zdatné se množit v pokrmech uložených v chladničce za teploty +4 °C, a to velice přispívá přenosu nákazy v lidské populaci. Při optimální teplotě +25 °C jsou bakterie nápadně pohyblivé, čehož si můžeme všimnout během mikroskopického pozorování nativního preparátu. (9) (3)

Mikroskopický obraz nám znázorňuje krátké nespořadující tyčinky, které jsou seskupené v párech nebo v řetězcích a mohou být zaměněny za streptokoky.

Existuje 13 sérotypů listerií (patogenní pro člověka jsou tři), které rozlišujeme podle tělových O-antigenů. Bičkové H-antigeny rozdělují bakterie na séroskupiny. (16) (3)

Obrázek 6 Listerie v elektronovém mikroskopu



Zdroj: <https://www.wikiskripta.eu/w/Listerie%C3%B3za>

Listerie jsou velmi nenáročné mikroby, kolonie na krevním agaru mohou být viditelné po 18-24 hodinách.

Rostou ve formě bělavých lesklých kolonií s perleťovým nádechem, kolem kterých se tvoří úzká zóna hemolýzy (díky produkci solubilních hemolyzínů), což je charakteristické i pro *Streptococcus agalactiae* a korynebakterie. Listerie na rozdíl od *S. agalactiae* tvoří enzym katalázu, kterou avšak produkují i korynebakterie.

Důležitým a nezbytným zdrojem pro růst patogenu je glukóza. (3) (5)

5.3 Epidemiologie:

Bakterie jsou v přírodě široce rozšířené, vyvolávají infekci nejen u člověka, ale také u různých zvířat, ptáků a ryb. Běžně se nachází ve vodě a v půdě. K přenosu dochází požitím

potravin obsahujících mikroby (obvykle jsou to mléčné výrobky, sýry a zeleninové saláty), eventuálně při přímém kontaktu s nakaženými zvířaty. Možný je i přenos infekce z matky na plod, buď během těhotenství anebo při porodu. (19)

5.4 Patogeneze:

Při alimentární cestě přenosu nákazy je vstupní branou tenké střevo. Do epiteliálních buněk listerie pronikají prostřednictvím invazivních faktorů – inernalinů. Krevním řečištěm se bakterie dostávají do různých orgánů, hromadí se především ve slezině a játrech. V těchto orgánech mikrob interaguje s makrofágy. Nitrobuněčné přežití v buňkách tenkého střeva, makrofázích, hepatocytech a splenocytech je možné díky listeriolysinu O a fosfolipáze, umožňujícím uvolnění patogenu z fagosomu do cytoplazmy fagocyta. Fagocytujícími buňkami v případě listeriózy kromě makrofágu mohou být i buňky obvykle nepohlcující cizorodé částice jako hepatocyty, některé buňky CNS, epitelie apod.

Bakteriální povrchový protein ActA je signifikantní faktor patogenity, umožňující přesun infekčního agens k buněčné membráně a dále i přestup z jedné buňky do druhé.

Vzhledem k tomu, že listerie je intracelulární mikrob, velkou roli hraje buněčná imunita nemocného. Imunodeficience Th1-lymfocytů jako důsledek jiného onemocnění (diabetes, cirhóza, malignita, stáří apod.) může mít negativní vliv na průběh choroby. (3) (9) (16)

5.5 Klinický obraz:

Inkubační doba trvá 10-70 dní. U osob s dostatečnou obranyschopností jsou klinické projevy většinou mírné až vůbec žádné. Lehký průběh se může projevit ve formě chřipce podobného onemocnění nebo ve formě febrilních gastroenteritid. Přesto však u novorozenců, gravidních žen, starších nemocných a u jedinců s oslabenou imunitou může být tato bakterie příčinou života ohrožujících stavů. (20)

U pacientů bývají přítomné typické klinické symptomy, zejména vysoká teplota, bolesti svalů, břicha, nevolnost, průjem.

Občas nemoc probíhá v tzv. oroglandulární formě s projevy povlakové tonzilitidy, zduřením submandibulárních uzlin a jejich eventuální kolikvací a může se podobat infekční mononukleóze. (16) (21) (3)

Průběh nemoci mohou zkomplikovat symptomy postižení centrálního nervového systému, častěji se jedná o hnisavou meningitidu, probíhající většinou u oslabených, imunokompromitovaných jedinců. Onemocnění je spojeno s vysokou úmrtností, která dosahuje 20–50 %. Vzácně dochází k formování mozkového abscesu se vznikem neurologické symptomatiky, převážně poruch hlavových i periferních nervů, mozečkovými příznaky nebo smyslovým postižením.

Většina listeriových infekcí u těhotných žen se vyskytuje během třetího trimestru, kdy je buněčná imunita snížena. Na rozdíl od infekce matky, která může mít asymptomatický průběh, transplacentární nákaza plodu často končí vážnými následky. Jsou to potrat, nízká porodní hmotnost novorozence, vrozené vývojové vady anebo tzv. granulomatosis infantiseptica s charakteristickou tvorbou granulomů a mikroabscesů v různých vnitřních orgánech.

Perinatálně se může novorozenec nakazit v případě porodu per vias naturales, při znečištění porodních cest stolicí matky, následkem čehož je rozvoj purulentní meningitidy, sepse a pneumonie se značně závažnou prognózou a vysokou letalitou. (3)

5.6 Laboratorní diagnostika:

K přímému průkazu listerií lze použít mikroskopické vyšetření. Vhodným biologickým materiálem mohou být vzorky likvoru, hnisu, plodové vody nebo biopsie tkáně s granulomatózním uzlíkem.

V případě meningitidy v mozkomíšním moku pozorujeme grampozitivní krátké tyčinky až kokobacily, přesto však v případě malého počtu bakterií je jejich identifikace obtížná.

Mikrob není náročný na kultivační podmínky, roste na krevním agaru při běžné chladničkové teplotě. Vykultivované kmeny bakterií mohou být určeny podle charakteristické morfologie, podmínek růstu, typického pohybu, biochemických vlastností a sekrece hemolyzinů.

V současnosti přispívá k výraznému zvýšení zachytu a pro rychlou diagnostiku DNA listerie přímo z biologického materiálu metoda PCR.

Sérologický průkaz nemá velký význam kvůli jeho nízké spolehlivosti (často dochází ke nespecifickým zkříženým reakcím). (5) (16)

5.7 Léčba a prevence:

Terapie se liší v závislosti na formě a stupni těžkosti onemocnění. Pacientům se závažnými klinickými projevy choroby, jejichž léčba vyžaduje podávání antibiotik, se indikuje ampicilin, který je lékem volby. V obzvlášť těžkých případech je nutné použít kombinaci ampicilinu s gentamycinem.

Použitelné jsou i další přípravky, například kotrimoxazol, meropenem anebo fluorované chinolony a azithromycin mající velkou výhodu dobrého průniku do buněk.

Kvůli odolnosti infekčního agens k cefalosporinům všech generací jsou tyto léky naprosto neúčinné.

Specifická preventivní opatření neexistují.

Nespecifická prevence spočívá ve správném skladování potravin a dostatečném tepelném zpracování pokrmů. Doporučuje se neukládat k sobě vzájemně neslučitelné potraviny v důsledku možného nebezpečí bakteriální kontaminace. Surové jídlo by nikdy nemělo přijít do styku s jídlem vařeným. Především se to týká rizikových skupin nemocných – gravidních žen, starších nebo imunodeficitních pacientů.

Při stanovení diagnózy často lékař nemyslí na listeriózu, pokud není pozitivní epidemiologická situace v daném regionu. Je třeba pamatovat i na tuto nákazu, aby pacientovi byla nasazena odpovídající a včasná terapie, aby se tak snížilo riziko možných komplikací. (16)

(21) (3) (4)

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

6.1 Hlavní cíl

Vytvořit přehled a popsat nejčastější agens, které způsobují uzlinový syndrom. Charakterizovat laboratorní diagnostiku těchto patogenů.

6.2 Dílčí cíl

1. Zpracovat data o počtech pacientů s danou patologií ve FN Plzeň za období 5 let v letech 2017 až 2021.

7 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

Výzkumná otázka č. 1: Ověřit, že výskyt akutních infekcí je u infekční mononukleózy stabilní, zatímco u ostatních sledovaných infekcí klesá.

Výzkumná otázka č. 2: Prokázat, že počet akutních infekcí klesá v této řadě od nejčastější po nejméně častou: infekční mononukleóza, toxoplazmóza, tularémie, listerióza.

8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Sledovaný soubor se skládal z vyšetřovaného biologického materiálu za období 5 let – od začátku roku 2017 do konce roku 2021. Většinou se jednalo o zpracování pacientské krve, ale také dalších druhů vzorků, například mozkomíšního moku, výtěru z rekta, výtěru z abscesu nebo žaludečního obsahu a dalších. Uvedený biologický materiál byl laboratorně vyšetřen v Ústavu mikrobiologie FN Plzeň, a to na úseku virologie, sérologie a parazitologie (infekční mononukleóza, toxoplazmóza, tularémie) a na úseku bakteriologie a mykologie (listerióza). Soubor s daty, který mi byl poskytnut z FN Plzeň, zahrnoval nejen pacienty z Plzně, ale i z celého Plzeňského kraje. Každý z vyšetřovaných patogenů, vyvolávajících jednu z popisovaných čtyř chorob, byl identifikován specifickými metodami, které budou podrobněji probrané v metodice bakalářské práce.

9 METODIKA PRÁCE

9.1 Infekční mononukleóza

9.1.1 Stanovení heterofilních protilátek pomocí latexaglutinačního testu za využití soupravy Oxoid Infectious Mononucleosis Kit

Použití:

Tento dvouminutový test se používá k identifikaci heterofilních (Paul-Bunnelových) protilátek, které jsou charakteristické pro infekční mononukleózu (IM). K vyšetření je možné použít jak plazmu, tak i sérum.

Princip:

Latexové partikule jsou senzitivizovány mononukleózovým antigenem z hovězích červených krvinek. Jasně viditelná aglutinace je průkazem diagnózy IM s vysokou pravděpodobností. Při kontaktu protilátek v séru/plazmě pacienta s latexovými částicemi se objeví viditelné shlukování značící pozitivní reakci.

Potřebné vybavení:

Souprava s potřebnými reagensy, laboratorní třepačka, lampa, pipety, fyziologický roztok, zkumavky, stopky, míchací tyčinky.

Pracovní postup:

Kvalitativní test. Lahvičku s latexovým reaktantem několikrát otočíme a kápneme 1 kapku do odděleného testovacího kroužku vymezeného pro každý vzorek zvlášť. Pipetou nebo aplikační tyčinkou přidáme 50 µl každého vyšetřovaného vzorku. Důkladně promícháme. Třepáme 2 minuty při rychlosti 100 otáček /min. Vyhodnotíme výsledky v závislosti na přítomnosti aglutinace nebo její absenci.

Semi-kvantitativní testování pozitivních vzorků. Do 8 označených zkumavek (popsaných číslicí 1 až 8) napipetujeme 0,2 ml fyziologického roztoku. Do zkumavky č. 1 přidáme 0,2 ml patientského vzorku. Promícháme a přeneseme 0,2 ml do zkumavky č. 2. Opět obsah zkumavky č. 2 promícháme a přeneseme 0,2 ml do zkumavky č. 3. Stejně pokračujeme až do poslední zkumavky, čímž dosáhneme dvounásobného ředění vzorků. Získaná řada ředění séra je 1:2 pro první zkumavku a 1:256 pro poslední zkumavku.

Hodnocení výsledků:

Kvalitativní test. Jako pozitivní interpretujeme test v případě jakékoliv míry shlukování. Pokud k žádné aglutinaci nedošlo a latexové partikule mají podobu mléčné suspenze, vyhodnocujeme reakci jako negativní.

Semi-kvantitativní test. Při testování naředěných pozitivních vzorků určíme jejich titr, který je obrácenou hodnotou posledního ředění, kde se vyskytla aglutinace. (22)

9.1.2 Průkaz heterofilních protilátek pomocí Ericsonova testu (OCH) za využití diagnostika KF COMPLEMENT set

Použití a princip:

Za použití tohoto diagnostika provedeme Ericsonův test (OCH – ox cell hemolysis), který detekuje heterofilní protilátky proti EBV v patientském séru. Princip Ericsonova testu tkví v tom, že heterofilní protilátka navázaná na hovězích erythrocytech v přítomnosti morčecího komplementu vyvolává hemolýzu. Ericsonův test ve srovnání s Paul-Bunnelovou reakcí má vyšší specifitu.

Potřebné vybavení:

Souprava a příslušné reagentie, hovězí krvinky, konzervované v Alseverově roztoku, mikrotitrační destička a třepačka, termostat, pipety, vodní lázeň.

Pracovní postup:

- Připravíme pracovní roztoky, vzorky a hovězí erythrocyty podle návodu.
- Do jamky č.1 mikrotitrační destičky napipetujeme 100 µl Melnikova roztoku.
- Do jamek č.3 až 9 napipetujeme 25 µl Melnikova roztoku.
- Do jamky č.1 přidáme 25 µl séra, promícháme.
- Z jamky č.1 odebereme 25 µl do jamky č.2.
- Z jamky č.1 přeneseme 25 µl do jamky č.3, promícháme a dále budeme pipetou přetahovat 25 µl až po jamku č.9.
- Do jamek č.2 až 9 napipetujeme 25 µl komplementu a potom 25 µl erythrocytů.

- Připravíme 3 kontroly: kontrola erytrocytů (50 µl Melnikova roztoku a 25 µl erytrocytů), kontrola komplementu (25 µl Melnikova roztoku, 25 µl komplementu, 25 µl erytrocytů), pozitivní kontrola (25 µl pozitivní kontroly, 25 µl komplementu, 25 µl erytrocytů).
- Protřepáme 25 s a inkubujeme v termostatu 30 minut při teplotě 37°C.
- Dále inkubujeme v chladničce 20 minut.
- Odečítáme výsledek.

Interpretace výsledků:

Za pozitivní reakci považujeme hemolýzu erytrocytů, přičemž obsah jamky má být rovnoměrně červený. Nejvyšší ředění vzorku, při kterém je hemolýza z 50 % pozitivní, je titrem protilátek. Titr vyšší než 1:30 interpretujeme jako pozitivní, titr 1:30 jako hraniční.

Při negativním výsledku nezlyzované krvinky sedimentují a tvoří knoflíkovitý útvar. (23)

9.1.3 Stanovení protilátek proti VCA EBV ve třídě IgG a IgM a stanovení protilátek proti EAD a EAR EBV ve třídě IgG v séru metodou nepřímé imunofluorescence

Použití a princip:

Stanovení protilátek je založeno na principu nepřímé imunofluorescenční analýzy a skládá se ze dvou kroků. V prvním kroku sérum pacienta neředěné roztokem PBS napipetujeme do jamek na sklíčku, které je potaženo buňkami tkáňových kultur (v našem případě LEP). Pokud sérum nemocného obsahuje specifické protilátky, se tyto protilátky naváží na tkáňové antigeny během první inkubace. Dále se odstraní nenavázané sérové protilátky promýváním. Ve druhém kroku se navázané protilátky detekují anti-lidskými imunoglobuliny, konjugovanými s fluoresceinem. Jsou to protilátky proti lidským IgG (konjugát IgG) značené FITC u detekce IgG a protilátky proti lidským IgM (konjugát IgM) značené FITC u detekce IgM. Během druhé inkubace se značené konjugáty váží jenom na antigen-protilátkový komplex, který se po promytí projeví jako specifické zelené fluorescenční zbarvení pod fluorescenčním mikroskopem.

Reagencie:

Reagencie jsou součástí diagnostického setu firmy Vidia.

Pomůcky:

Termostat, vodní lázeň, centrifuga, fluorescenční mikroskop, pipety, plastový ták, odsávačka.

Pracovní postup:

- Naředíme PBS pufr 1:20 (50 ml PBS a 950 ml deionizované vody).
- Napipetujeme do zkumavky 100 μ l séra a PBS v poměru 1:10 (0,1 ml séra + 0,9 ml PBS). Pro detekci protilátek proti VCA ve třídě IgM a proti EAR, EAD ve třídě IgG).
- Stanovení VCA IgG ve dvou titrech ředění 1:40 a 1:160. Do mikrotitrační destičky napipetujeme sérum ředěné 1:10 a pipetou rozředíme v PBS na příslušná ředění geometrickou řadou (přenášíme 100 μ l do následujících jamek, ve kterých už je napipetováno 100 μ l PBS).
- Sklíčka vytemperujeme na pokojovou teplotu, nakapeme sérum v ředění 1:10 (stanovení IgM) a inkubujeme ve vlhké komůrce 2 hodiny.
- Po 1 hodině inkubace nakapeme na příslušná sklíčka séra pro stanovení IgG ve dvou titrech ředění a séra na detekci EA-R, EA-D v ředění 1:10. Inkubujeme 1 hodinu.
- Na sklíčka napipetujeme kontroly. Negativní a pozitivní kontrola v ředění 1:10 pro IgM, EA-R, EA-D a pro IgG negativní kontrola 1:10 a pozitivní kontrola 1:40.
- Po inkubaci sklíčka oplachujeme v PBS, přebytek vzorku odsáváme odsávačkou.
- Napipetujeme konjugát pro IgM v ředění 1:10, pro IgG a EA-R, EA-D v ředění 1:20.
- Inkubujeme 1 hodinu, oplachujeme v PBS, osušíme, montujeme, kryjeme sklíčkem a prohlížíme pod mikroskopem.

Hodnocení výsledků:

Výsledky hodnotíme semikvantitativně v titrech 1:40, 1:160 (protilátky třídy IgG) a v titru 1:10 (protilátky třídy IgM). Pozitivní výsledek se jeví ve fluorescenčním mikroskopu jako svítivá zelená barva. (24)

9.1.4 Stanovení protilátek ve třídě IgG proti EBNA-1 v séru metodou EIA na analyzátoru DSX

Princip metody:

Analytická metoda, která pomocí imunochemické reakce s enzymatickou identifikací umožňuje detekovat v patientském vzorku koncentraci protilátky IgG proti EBNA EBV.

Diagnostická souprava obsahuje mikrotitrační proužky s jamkami potaženými antigeny. Pokud patientské vzorky obsahují příslušné protilátky, tyto protilátky se naváží na antigen. Dále se přidá enzymový konjugát (peroxidázou značené protilátky proti lidským IgG protilátkám), který se může vázat jen na komplex antigen-protilátka. Po napipetování enzymatického substrátu (peroxid vodíku) a chromogenu (tetramethylbenzidinu) pomocí enzymu peroxidázy začíná proces přeměny substrátu. Tato přeměna vyvolává změnu zabarvení chromogenu, jehož intenzita je přímo úměrná koncentrací detekovaných protilátek.

Reagencie:

Diagnostický set Anti-EBNA-1 (IgG) firmy EUROIMMUN.

Přístroje a pomůcky:

DSX automatizovaný systém ELISA, vodní lázeň, centrifuga.

Pracovní postup:

Testy vzorků jsou prováděny automatizovaným systémem DSX a výsledky vyšetření se automaticky převedou do laboratorního informačního systému.

Hodnocení výsledků:

Výsledky hodnotíme semikvantitativně ve formě indexu pozitivity (poměr hodnot extinkce vzorku a kontrolního séra – cut off). (25)

9.2 Toxoplazmóza

9.2.1 Stanovení protilátek ve třídě IgM, IgA a IgG metodou EIA pomocí imunoenzymatické soupravy SmartEIA

Princip:

IgM a IgA

Díky této soupravě můžeme stanovit specifické protilátky proti *T. gondii* ve vzorku. Použijeme typ capture EIA metody, což znamená, že na pevné fázi je navázaná zvířecí protilátka (myší) proti lidským imunoglobulinům IgM a IgA, dále protilátka z patientského vzorku a následně tracer (antigen *T. gondii* se značenou křenovou peroxidázou protilátkou). Aktivita enzymu se detekuje prostřednictvím substrátu TMB na základě barevné reakce – zmodrání roztoku. Reakci přerušujeme přidáním zastavovacího roztoku, kdy můžeme pozorovat změnu modré barvy na žlutou. Intenzitu zbarvení konečného produktu měříme fotometrem – je přímo úměrná koncentraci protilátek ve vzorku.

IgG

Při detekci IgG použijeme typ sandwich EIA metody. Na pevnou fázi je navázaný specifický antigen *T. gondii*, druhou vrstvou je protilátka z patientského séra a následně značená protilátka (zvířecího původu proti lidskému IgG) konjugovaná s křenovou peroxidázou. Další postup a princip zůstává stejný jako u capture EIA metody.

Přístroje a pomůcky:

Souprava SmartEIA a příslušné reagensie, pipety a jednorázové špičky, zařízení na promývání, stopky, termostat, fotometr.

Pracovní postup:

IgM a IgA

- Reagensie vytemperujeme na pokojovou teplotu a promícháme.
- Naředíme pracovní roztoky a patientské vzorky dle návodu.
- Dle pracovního schématu napipetujeme kontroly a vzorky. Jamku A1 necháme prázdnou (blank). Do 1 jamky dávkujeme 100 µl negativní kontroly, do 2 jamek 100 µl CUT OFF, do 1 jamky napipetujeme 100 µl pozitivní kontroly a do zbývajících jamek 100 µl naředěných vzorků.

- Destičku přikryjeme a inkubujeme v termostatu 60 minut. Poté 5x promyjeme promývacím roztokem.
- Napipetujeme 100 µl Traceru do všech jamek kromě A1 (blank).
- Destičku přikryjeme, inkubujeme 60 minut a poté 5x promyjeme.
- Napipetujeme do všech jamek 100 µl substrátu TMB.
- Destičku přikryjeme a inkubujeme ve tmě 20 minut.
- Dávujeme 100 µl Zastavovacího roztoku a měříme absorbanci při vlnové délce 450 nm.

IgG

- Reagencie vytemperujeme na pokojovou teplotu a promícháme.
- Naředíme pracovní roztoky a patientské vzorky dle návodu.
- Dle pracovního schématu pipetujeme kontroly (kalibrátory) a vzorky pacientů.
- Semikvantitativní vyhodnocení v indexu pozitivity (IP): Jamku A1 necháme prázdnou (blank). Napipetujeme 100 µl negativní kontroly (Kalibrátor 1) do 1 jamky, dávujeme 100 µl CUT OFF (Kalibrátor 2) do 2 jamek, napipetujeme 100 µl pozitivní kontroly (Kalibrátor 3) do 1 jamky a do zbylých jamek 100 µl naředěných patientských vzorků.
- Kvantitativní vyhodnocení v jednotkách IU/ml: Jamku A1 necháme prázdnou (blank). Napipetujeme 100 µl negativní kontroly (Kalibrátor 1) do 1 jamky. Dávujeme 100 µl CUT OFF (Kalibrátor 2) do 2 jamek. Napipetujeme 100 µl pozitivní kontroly (Kalibrátor 3) do 2 jamek a do ostatních jamek 100 µl naředěných patientských vzorků.
- Destičku přikryjeme, inkubujeme v termostatu 60 minut a 5x promyjeme promývacím roztokem.
- Napipetujeme do všech jamek kromě A1 100 µl konjugátu.
- Destičku přikryjeme, inkubujeme 60 minut a poté 5x promyjeme.
- Napipetujeme do všech jamek 100 µl substrátu TMB.
- Destičku přikryjeme a inkubujeme ve tmě 20 minut.
- Dávujeme 100 µl zastavovacího roztoku a měříme absorbanci při vlnové délce 450 nm.

Interpretace výsledků:

Semikvantitativní vyhodnocení v indexu pozitivity (IP) – IgA, IgM, IgG:

Pro vyhodnocení získaných výsledků potřebujeme vypočítat Index pozitivity (IP).

$$IP = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Průměrná absorbance CUT – OFF}}$$

V případě IP menšího než 0,9 považujeme výsledek za negativní. IP od 0,9 do 1,1 je hraniční (můžeme opakovat za 2 až 6 týdnů) a IP vyšší než 1,1 hodnotíme jako pozitivní.

Kvantitativní vyhodnocení v jednotkách IU/ml – IgG:

IgG (kvantitativní vyhodnocení v jednotkách IU/ml). Sestrojíme kalibrační křivku, kdy na ose X jsou koncentrace kalibrátoru v IU/ml a na ose Y absorbance. Odečteme hladiny protilátek. V případě hladiny protilátek větší než 240 IU/ml vzorek naředíme a test zopakujeme. Pokud je hladina protilátek nižší než 5,4 IU/ml, hodnotíme výsledek jako negativní. Rozmezí 5,4 až 6,6 IU/ml znamená, že výsledek je hraniční a hladina více než 6,6 nám ukáže na pozitivitu v patientském vzorku. (26) (27) (28)

9.2.2 Stanovení celkových protilátek proti T. gongii metodou komplementfixace (KFR)

Princip:

Pokud v patientském séru jsou přítomné protilátky proti toxoplasmě, vznikne komplex antigen-protilátka, který se váže se složkami komplementu. Při pozitivitě vzorku dodané do reakce beraní erythrocyty nehemolyzují. Při negativním výsledku (protilátky v séru nejsou) se komplex antigen-protilátka nevytvoří, komplement je volný a způsobí rozpad erythrocytů.

Reagencie:

Reagencie firmy TestLine, veronalový pufr (VP), beraní krvinky konzervované v Alseverově roztoku, deionizovaná voda.

Přístroje a pomůcky:

Pipety, třepačka, centrifuga, stopky, vodní lázeň, termostat, skleněné laboratorní válce a kádinky, vlhká komůrka.

Pracovní postup:

1. den

- Inaktivujeme séra ve vodní lázni 60 minut.
- Naředíme veronalový pufr, antigen a komplement dle návodu a uložíme je do lednice na 15 minut.
- Připravíme a nadepíšeme destičky. Napíšeme čísla vzorků a kontroly (pozitivní, negativní). 1. sloupec je pomocný, 2. slouží pro kontrolu antikomplementarity, od 3. sloupce nadepíšeme titry (8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048, 4096). Poslední řádek na poslední destičce oddělíme fixem a vyznačíme kontroly HS, A, C2, C1, C1/2, C1/4.
- Napipetujeme do všech jamek 25 μ l VP a do kontroly A+2x 25 μ l VP do všech kontrol C + 4x 25 μ l VP do kontroly HS.
- Do jamek v 1. sloupci dávkujeme 25 μ l sér a kontrol a rozředíme je do ostatních jamek.
- Dávkujeme 25 μ l antigenu od 3. jamky+25 μ l do kontroly A.
- Dávkujeme 50 μ l komplementu od 2. jamky + 50 μ l do kontroly A + 50 μ l do kontroly C2.
- Na skleněnou destičku napipetujeme po 200 μ l VP do 3 jamek.
- Přidáme 200 μ l komplementu do 1. jamky skleněné destičky a naředíme do ostatních 2 jamek.
- Napipetujeme z 1. jamky 50 μ l do kontroly C1, z 2. jamky 50 μ l do kontroly C1/2, ze 3. jamky 50 μ l do kontroly C1/4.
- Nadávkujeme 25 μ l VP do jamek 2. sloupce.
- Protřepeme a necháme do 2. dne ve vlhké komůrce v ledničce.

2. den

- Destičky z lednice přeložíme do termostatu.
- Ze stočených beraních erytrocytů vytvoříme 3 % suspenzi krvinek (30 ml VP + 0,9 ml propraných erytrocytů).
- Naředíme lyofilizovaný amboceptor (AMB) dle návodu na lahvičce.
- Připravíme hemolytický systém (30,9 ml erytrocytů + 30,9 naředěný AMB).
- Promícháme a dáme do termostatu na 30 minut.

- Napipetujeme 25 μ l hemolytického systému od 2. jamky včetně kontrol HS, A, C.
- Protřepeme, vložíme do termostatu (ve vlhké komůrce) a po 2 hodinách odečítáme výsledky.

Hodnocení výsledků:

Pozitivita testu se hodnotí jako sedimentace a nahromadění krvinek na dně jamky destičky a negativita se projeví tím, že obsah jamky má rovnoměrně červenou barvu. (29)

9.3 Tularémie

9.3.1 Sérologický průkaz protilátek proti *F. tularensis* metodou rychlé a pomalé aglutinace

Obsah soupravy:

Antigen *F. tularensis* – je inaktivovanou bakteriální suspenzí, konzervovanou fenolem.

Kontrolní pozitivní sérum – jedná se o králičí sérum, které má v sobě specifické protilátky proti francisele, konzervované fenolem.

Fyziologický roztok s fenolem.

Pracovní postup:

Rychlá aglutinace

- Na sklíčko kápneme kapku (přibližně 0,04 ml) krve pacienta, vedle které nakapeme 5 kapek (přibližně 0,2 ml) antigenu.
- Skleněnou tyčinkou smícháme všechny kapky a roztáhneme po povrchu.
- Na sklíčko nakapeme kapku kontrolního pozitivního séra, které předem naředíme fyziologickým roztokem s fenolem na pracovní titr 8.
- Dále k séru přidáme kapku antigenu, skleněnou tyčinkou vše smícháme.
- Třepeme sklíčko na třepačce 3 min.

Pomalá aglutinace

- Testované patientské sérum naředíme fyziologickým roztokem s fenolem ve vze-
stupné řadě od 1+9, 1+19, 1+39 atd. po 0,5 ml.
- Přidáme 0,5 ml naředěného (poměr 1+4) antigenu, což způsobí dvounásobného na-
ředění séra.
- Inkubujeme při teplotě + 37 °C 20 hodin a potom 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Hodnocení výsledků:

Rychlá aglutinace se projeví při pozitivitě produkcí vloček a projasněním. U negativního výsledku se neobjeví charakteristické vločky a projasnění.

Pomalá aglutinace se v případě positivity testu projeví zřetelným shlukováním v titru 1:80 a vyšším. Pozitivní výsledek v titru 1:40 je hraniční a vyšetření je potřeba provést ještě jednou s odstupem 1-2 týdnů.

Intenzitu rychlé aglutinace můžeme vyjádřit křížky: +++ jsou charakteristické pro velký shluk a celkové vyčeření tekutiny, v případě ++ pozorujeme 50 % aglutinace a tekutina je jemně zakalená, při + detekujeme částečné shlukování a tekutina je hodně zakalená, a nakonec znaménkem mínus označíme nulovou aglutinaci a značný zákal tekutiny. (30)

9.4 Listerióza

Pro diagnostiku akutního onemocnění sérologická vyšetření nejsou vhodná a nepřímá identifikace, která byla základem výše zmíněných chorob, se běžně neprovádí. Přítomnost infekčního agens lze ověřit pomocí kultivace z krve, likvoru, hnisu, a u gravidních žen také z plodové vody či placenty. K nejčastěji odebíranému biologickému materiálu (z poskytnutých dat FN Plzeň) patří krev a mozkomíšni mok, které budou popsány dále.

9.4.1 Bakteriologické vyšetření krve a jiných primárně sterilních tekutin automatizovaným kultivačním systémem

Účel a předmět:

Automatizovaný přístroj pro hemokultivaci slouží k průkazu přítomnosti různých druhů patogenů v krvi nemocného. Získaný výsledek může prokázat výskyt bakteriémie v době odběru vzorku. Tato metoda má velký význam při diferenciální diagnostice u pacientů s nejasnými febrilními stavy. Detekce bakteriémie, identifikace infekčního agens a následný test citlivosti na antibiotika může být rozhodujícím momentem v další terapii nemocného.

Automatizovaný kultivační systém se dá použít i k průkazu mikroorganismu z jiných původně sterilních tekutin, například z výpotku dutiny břišní, osrdečníku, ze synoviální tekutiny nebo mozkomíšního moku.

Vyšší efektivita této metody ve srovnání s klasickou kultivací na pevných půdách je založena na větším objemu patientské krve s malou mikrobiální náloží a prodlouženém času kultivace. Díky zkoušce na sterilitu automatizovaný systém včas zajistí detekci kontaminace.

Princip metody:

Kultivace odebraného sterilního vzorku probíhá ve speciálních hemokultivačních lahvích. V souvislosti s možným zachytem patogenů s rozdílnými nároky na kultivační podmínky máme k dispozici 5 typů lahvíček s různou sestavou tekuté kultivační půdy. Inkubace, míchání a monitorování pro identifikaci růstu mikrobů probíhá v detekčním systému BacT/ALERT VIRTUO. Na dně každé lahvičky se nachází speciální senzor modrozelené barvy. V případě výskytu infekčního agens, který produkuje CO₂, se změní pH a následně i barva senzoru z modrozelené na žlutou. Tuto změnu detekuje přístroj a ohodnotí příslušnou lahvičku jako pozitivní. Pozitivní hemokulturu vyočkujeme na tuhou kultivační půdu, provedeme mikroskopické vyšetření preparátu a test citlivosti na antibiotika.

Reagencie, přístroje a pomůcky:

Hemokultivační lahvičky BACT/ALERT, univerzální a jiné speciální půdy (krevní agar pro listerie), BACT/ALERT VIRTUO, mikroskop, termostat, plynový kahan, lednička a spotřební materiál.

Pracovní postup:

Lahvičky po přijetí přidělíme protokolové číslo a vložíme ji do automatického zařízení. Kultivace trvá 5 dní a po uplynutí této doby se lahvička přístrojem ohodnotí jako negativní. Pozitivní hemokultury, které jsou mikroskopicky negativní, se musí vrátit zpět do zařízení až do okamžiku, kdyby je přístroj označí za negativní (5 dní od prvního vložení).

Hlášení a konzultační činnost:

Každá pozitivní hemokultura se hlásí bez prodlení ošetřujícímu lékaři. Mikrobiolog zajišťuje poskytování konzultací ohledně cílené antibiotické léčby, případných dodatečných vyšetření zaměřujících na co nejrychlejší určení diagnózy. (31)

9.4.2 Bakteriologické vyšetření likvoru mikroskopicky a kultivačně

Princip metody a účel:

Za normálních okolností je likvor sterilní. Prováděná kultivační bakteriologická vyšetření se používají k potvrzení nejčastějších bakteriálních příčin akutní meningitidy (například *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) ale i jiných původců infekcí (*Listeria monocytogenes*), způsobující zánět mozkových blan u imunodeficitních a starších pacientů, novorozenců a kojenců do 3 měsíců. Toto vyšetření je přínosné u nemocných s drenáží mozkomíšního moku a pomáhá včas diagnostikovat výskyt případné komplikující infekce.

Pro realizaci úspěšné kultivace na pevných nebo v tekutých médiích potřebujeme aerobní podmínky s 5-10 %/ CO₂ a teplotu 35 +/- 2 °C.

Důležitým doplňkem kultivačního vyšetření je barvení vykultivovaných patogenů dle Grama.

Reagencie, přístroje a pomůcky:

Komerční reagencie, reagencie k barvení dle Grama, agary Columbia, čokoládový a Endo, mozkosrdcový bujón, Pastorex TM Meningitis BIO-RAD, centrifuga, barvicí automat, mikroskop, termostat, plynový kahan, CO₂ inkubátor a další spotřební materiál.

Pracovní postup:

Vyšetření mozkomíšního moku se provádí statimově. 0,5 ml vzorku se zmrazí pro případ eventuálních dalších analýz. Centrifugujeme 5-10 minut při 4000 ot/min. Supernatant na dně zkumavky použijeme ke kultivačnímu a mikroskopickému vyšetření. Inkubace se provádí při CO₂ 4-10 % 24-48-72 hodin při teplotě 35 +/- 2 °C. První odečítání kultur probíhá za 24 hodin, v případě negativního výsledku za 48 a 72 hodin.

Hlášení a hodnocení výsledků:

Výsledky mikroskopického vyšetření mají být vždy ihned hlášeny na oddělení. Lékař-mikrobiolog také hlásí průběžné výsledky kultivace v případě positivity. Infekční agens způsobující bakteriální meningitidu se řadí mezi invazivní kmeny. Meningokoky, pneumokoky, hemofily, listérie se posílají do národních referenčních laboratoří. (32)

10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

10.1 Četnost vybraných onemocnění za období 2017 až 2021

Statistická data ke zpracování za dobu od 2017 do 2021 byla poskytnuta FN Plzeň. Jedná se o biologický materiál zpracovaný v Ústavu mikrobiologie v souvislosti s laboratorním vyšetřením čtyř vybraných infekcí – mononukleózy, toxoplazmózy, tularémie a listeriózy. Celkem bylo dodáno 14971 vzorků, z nich 9219 vzorků k diagnostice mononukleózy, 4198 vzorků k diagnostice toxoplazmózy, 1513 vzorků k diagnostice tularémie a 41 vzorků k diagnostice listeriózy.

Na základě získaných laboratorních vyšetření byla provedena jejich interpretace a následné vyřídění akutní fáze popsaných onemocnění, což znázorňuje uvedena tabulka.

Tabulka 2 Četnost akutních infekcí vybraných chorob

Četnost akutních infekcí vybraných chorob za dané období					
Infekce	Rok				
	2017	2018	2019	2020	2021
Mononukleóza	112	86	77	33	24
Toxoplazmóza	24	19	8	14	14
Tularémie	12	7	3	2	3
Listerióza	1	5	4	3	3

Zdroj: vlastní zpracování dle dat z Ústavu mikrobiologie FN Plzeň

Obecně platí, že problematika diagnostiky je komplexní a výsledky jednotlivých metod nelze hodnotit izolovaně.

Pro stanovení akutního stadia mononukleózy byly vyhodnoceny výsledky testů (přítomnost specifických protilátek) proti virovým antigenům VCA, EA-D, EBNA metodou ELISA. Na probíhající akutní mononukleózu nám poukazuje pozitivní VCA-IgM (v titru 1:10 a výše) a detekovatelná difúzní složka EA-D, naopak anti-EBNA-IgG musí být negativní, protože se protilátky tvoří během 3 měsíců po infekci. Pozitivita provází pozdní fázi onemocnění nebo jeho reaktivaci.

Probíhající akutní toxoplazmózu můžeme potvrdit vysokým titrem (1:128 a výše) celkových protilátek ve vzorcích pacientů při použití metody KFR. Strmý vzestup IgA, IgM, stanovený

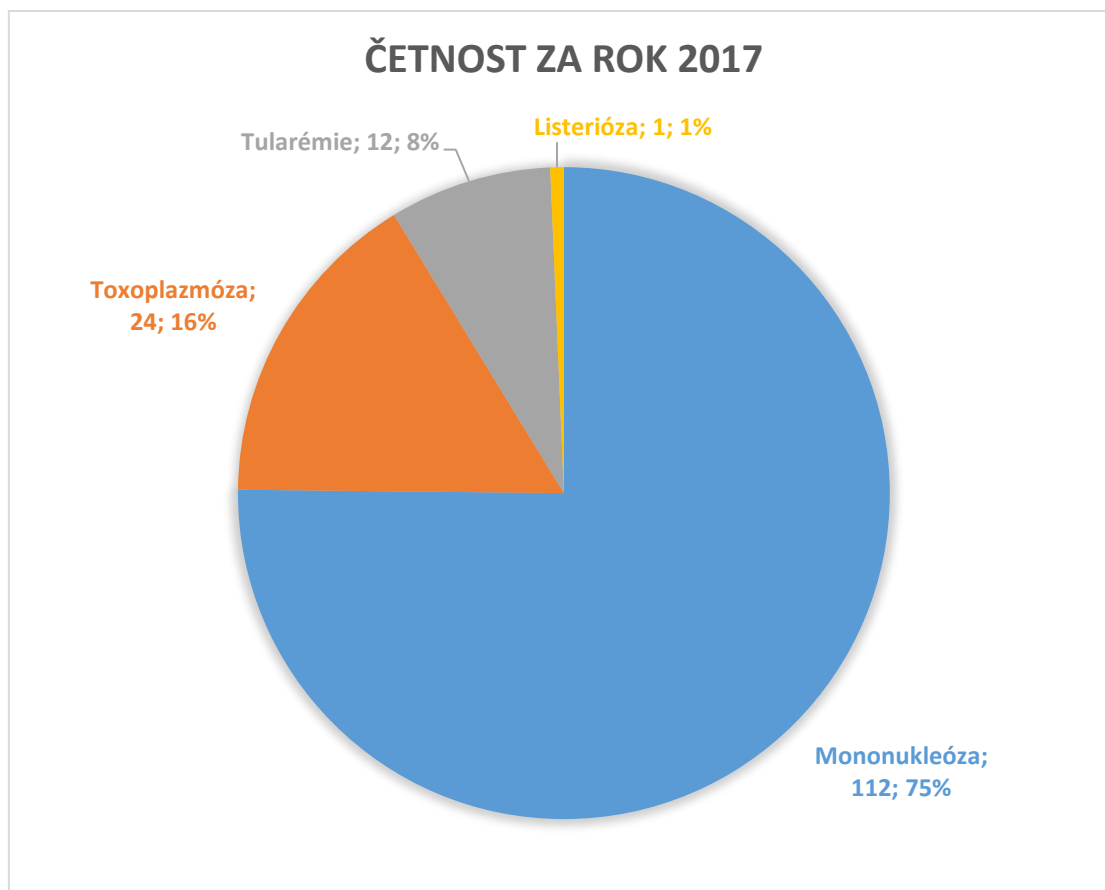
pomocí ELISA metody (index pozitivity vyšší než 1,1) je také charakteristický pro akutní stadium nemoci, avšak hladina imunoglobulinů G stoupá pozvolněji a ve výsledcích může být různá.

Při hodnocení akutní fáze tularémie bereme v potaz jednu z prováděných metod – pomalou aglutinaci, která se projeví v titru 1:160 a výše. Rychlá aglutinace, jejíž výhodou je rychlost a nenáročnost, není však pro akutní stadium rozhodující, může být jak pozitivní, tak i negativní.

Průkaz akutní listeriózy se zakládá na izolaci *L. monocytogenes*. Sérologické reakce běžně prováděné u výše popsaných nemocí nemají valný význam.

10.2 Porovnání četností akutních infekcí vybraných onemocnění v daném roce za období 2017 až 2021

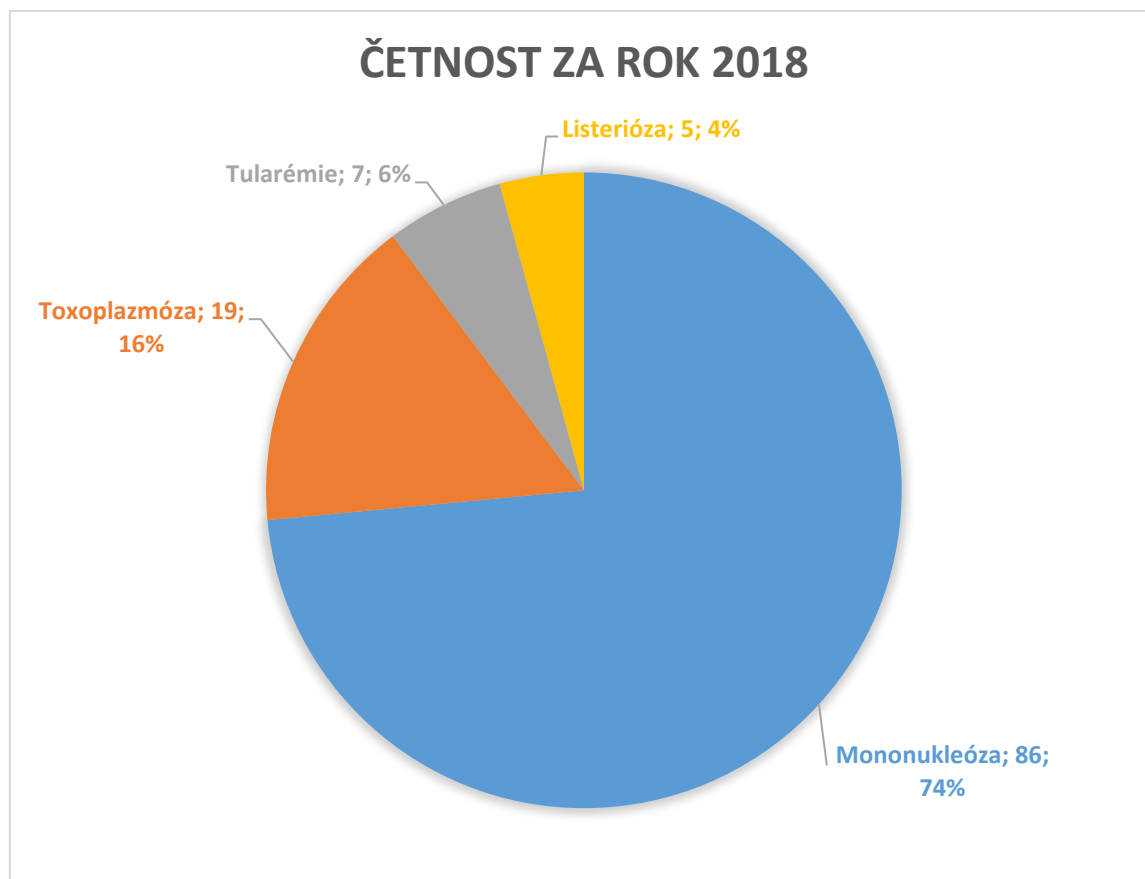
Graf 1 Počet vybraných akutních infekcí v roce 2017



Zdroj: vlastní zpracování dle dat Ústavu mikrobiologie FN Plzeň

V grafu č.1 je znázorněno množství akutních případů mononukleózy 112 (75 %), toxoplazmózy 24 (16 %), tularémie 12 (8 %) a listeriózy 1 (1 %). Při porovnání je zřejmé, že počet nemocných s akutním stadiem onemocnění nepochybně převažuje u mononukleózy.

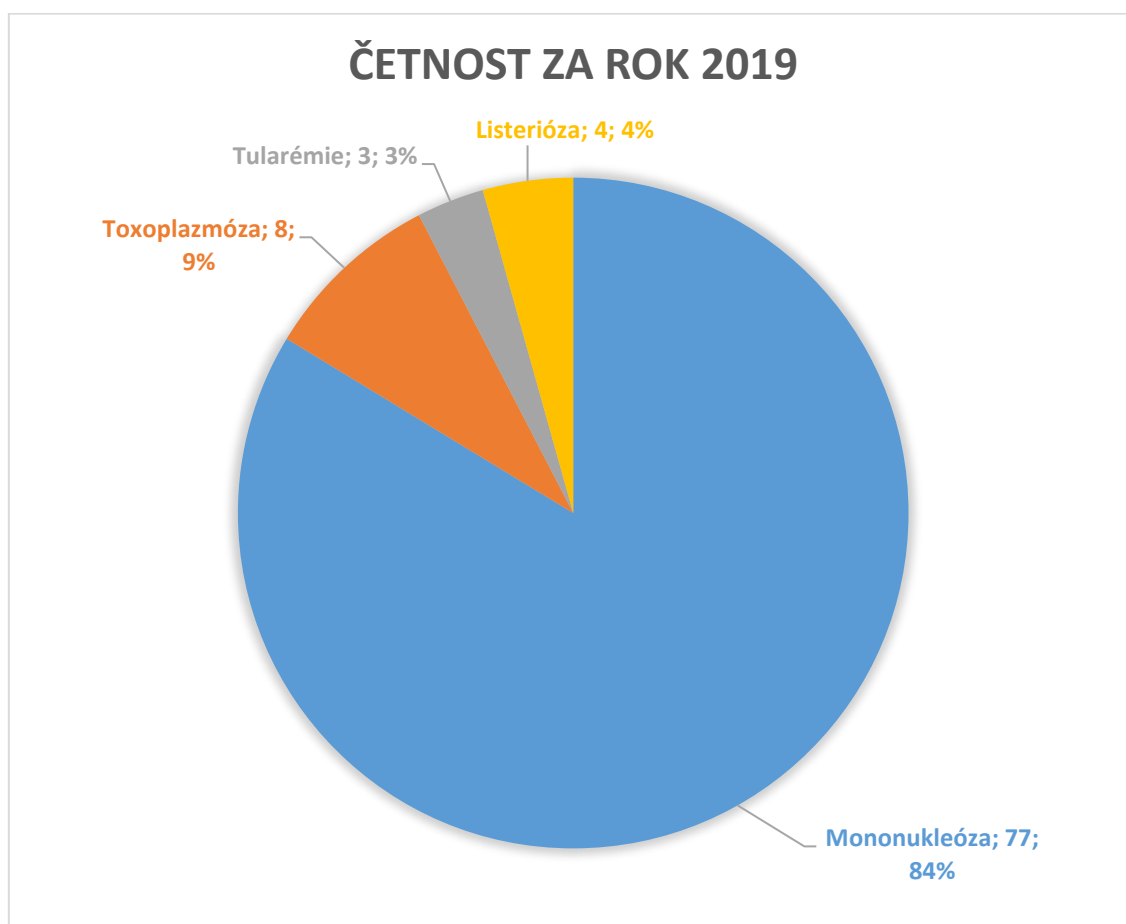
Graf 2 Počet vybraných akutních infekcí v roce 2018



Zdroj: vlastní zpracování dle dat Ústavu mikrobiologie FN Plzeň

Výsledky za rok 2018 jsou relativně podobné, kvantitativně převládá mononukleóza s počtem akutních případů 86 (74 %), a dále sestupně toxoplazmóza 19 (16 %), tularémie 7 (6 %), listeriόza 5 (4 %).

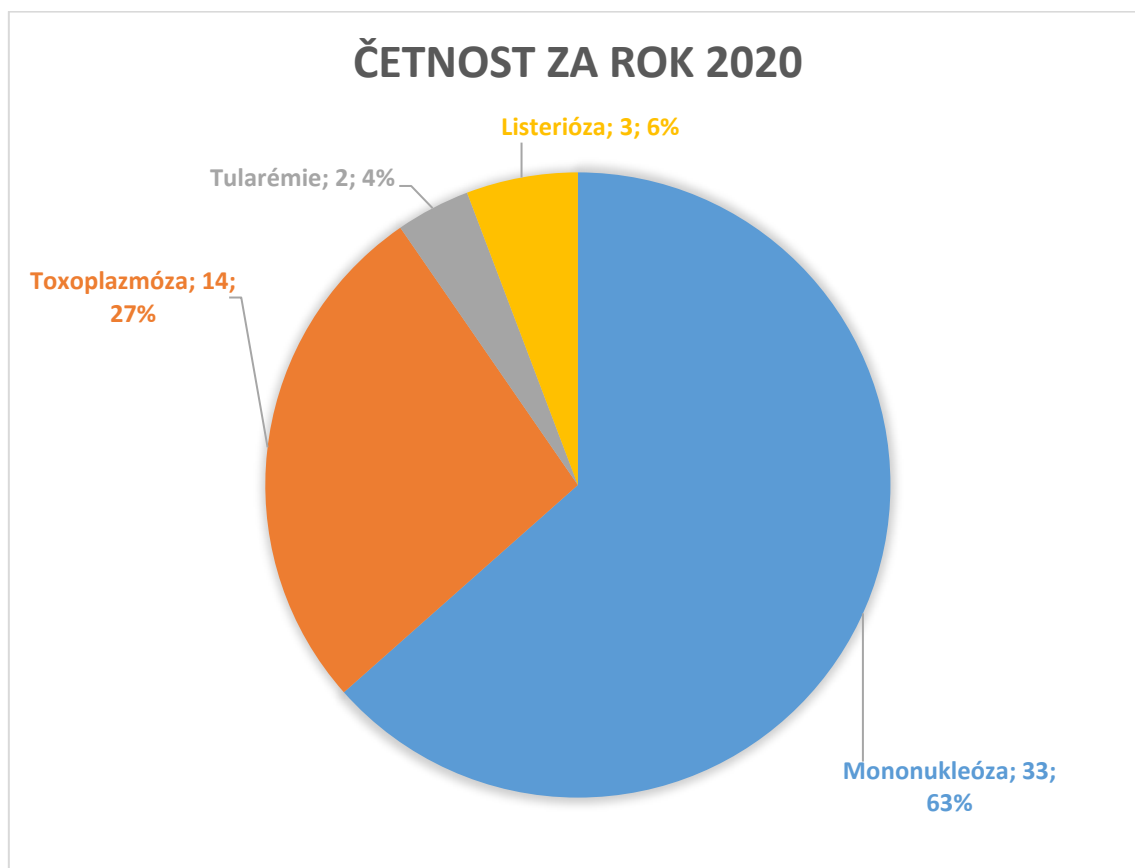
Graf 3 Počet vybraných akutních infekcí v roce 2019



Zdroj: vlastní zpracování dle dat Ústavu mikrobiologie FN Plzeň

V roce 2019 zaznamenáváme obdobnou situaci s tím, že procentuální podíl mononukleózy 77 (84 %) je v porovnání s rokem 2017 a 2018 ještě výraznější. Akutní toxoplazmóza byla zjištěna v 8 případech (9 %), tularémie ve 3 případech (3 %), listeriόza ve 4 případech (4 %).

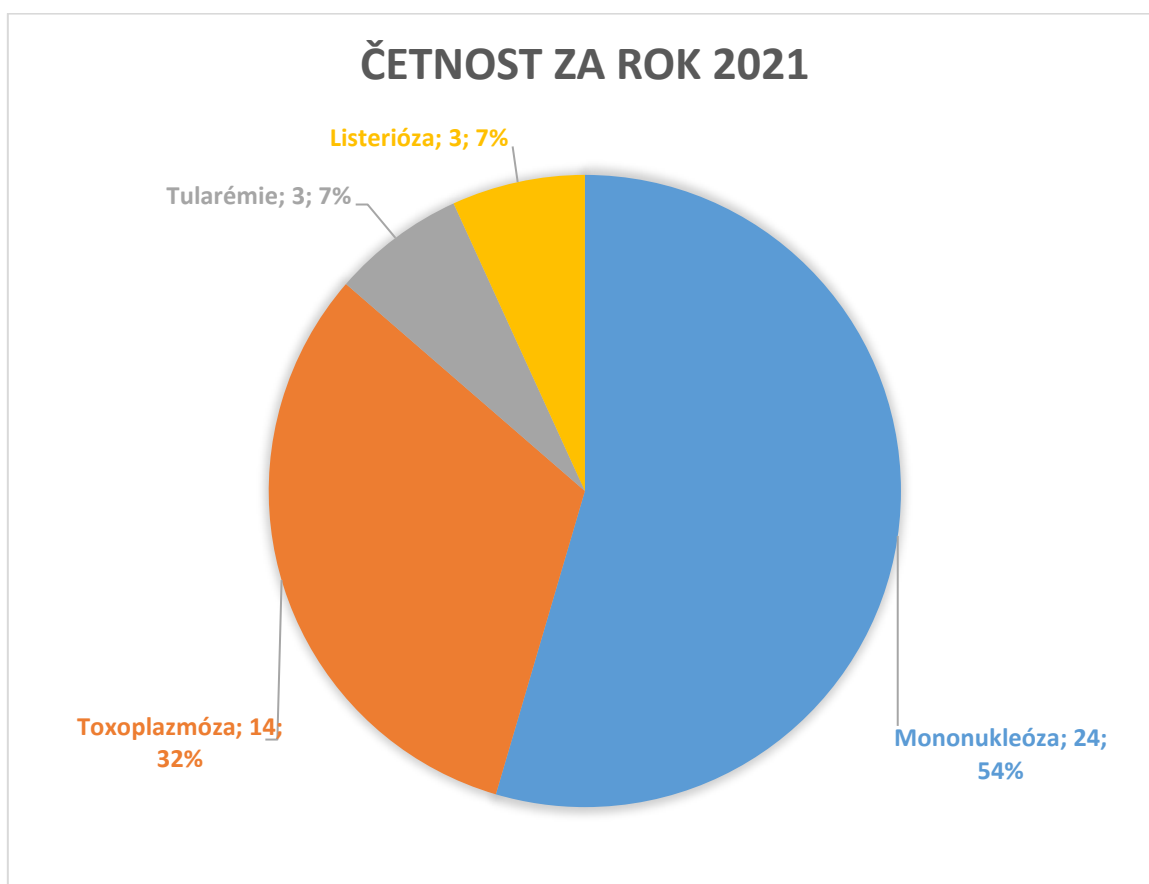
Graf 4 Počet vybraných akutních infekcí v roce 2020



Zdroj: vlastní zpracování dle dat Ústavu mikrobiologie FN Plzeň

Na grafu č.4 je vidět, že v předešlých letech mělo akutní stadium mononukleózy více pacientů 33 (63 %), naopak počet akutních infekcí toxoplazmózy opět stoupá 14 (27 %), tularémie 2 (4 %) a listeriόza 3 (6 %).

Graf 5 Počet vybraných akutních infekcí v roce 2021

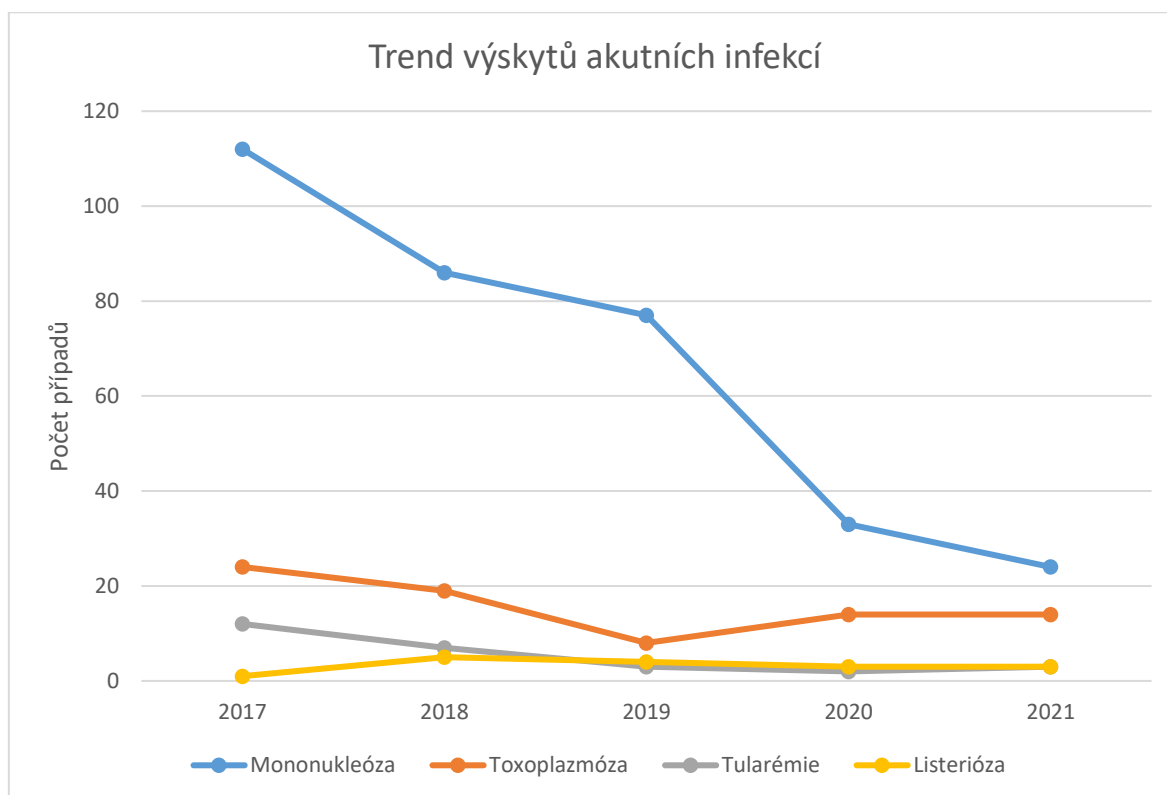


Zdroj: vlastní zpracování dle dat Ústavu mikrobiologie FN Plzeň

V roce 2021 pozorujeme stále nižší počet vzorků nemocných s akutní fází mononukleózy 24 (54 %), toxoplazmóza 14 (32 %), tularémie 3 (7 %), listerióza 3 (7 %).

10.3 Trend výskytu akutních případů vybraných onemocnění za dobu 2017 až 2021

Graf 6 Trend vývoje vybraných akutních infekcí



Zdroj: vlastní zpracování dle dat Ústavu mikrobiologie FN Plzeň

Trend vyplývající z grafu vyjadřuje tendenci vývoje počtu akutních fází zkoumaných onemocnění v čase.

U pacientů s akutní mononukleózou má křivka výrazně klesající charakter. U ostatních infekcí hodnoty varírují, ale výkyvy nejsou velké a trend poklesu či vzestupu je nejednoznačný.

Významným rysem, který lze vyčíst z výšečových grafů, je to, že procento akutních případů EBV infekce násobně převyšuje procento akutních stádií u ostatních onemocnění (tvoří 1/2–3/4 všech akutních případů).

DISKUZE

Nejčastější patogeny působící uzlinový syndrom, jejich obecná charakteristika a přehled byly popsány v teoretické části, která dále zahrnovala základní laboratorní vyšetření a postupy uváděné v současné literatuře. V praktické části bakalářské práce, konkrétně v metodice, byly podrobněji probrány rutinně prováděné laboratorní metody v Ústavu mikrobiologie FN Plzeň. Tím byl naplněn hlavní cíl mé bakalářské práce.

Díličímu cíli této práce, který se týkal zpracování dat o počtech pacientů s lymfadenopatií, byla v praktické části věnována kapitola „Analýza a interpretace výsledků“. Předmětem mého zájmu byly nemocní s vybranými akutními onemocněními (infekční mononukleóza, toxoplazmóza, tularémie, listerióza) v období od r.2017 do r.2021.

Tabulka č.2, výsečové grafy za jednotlivé roky i spojnicový graf jasně vypovídají o převládajícím počtu akutních případů infekční mononukleózy. Ostatní infekce jsou laboratorně potvrzené méně často od relativně více diagnostikované toxoplazmózy, přes tularémii až po listeriózu, která má celkový počet akutních případů nejvyšší. Tímto je výzkumná otázka č.2 ověřena jako pravdivá.

Předpoklad, že výskyt akutních infekcí je u infekční mononukleózy stabilní, zatímco u ostatních sledovaných infekcí klesá (výzkumná otázka č.1), se prokázat nepodařilo. Vývoj množství akutních fází u EBV nákazy je výrazně klesající. U ostatních infekcí není trend jasně vyjádřený. U tularémie a listeriózy je navíc ovlivněný malým počtem případů.

Infekční mononukleóza patří mezi relativně častá onemocnění – v lidské populaci je značně rozšířena a infikovat se touto nákazou je velmi snadné. Může být zaměněna s chřipkou nebo bakteriální angínou. Vyšetření pacienta a následná diagnóza může být tedy stanovena až po neúčinné ATB léčbě nebo při přetrvávajících potížích, proto lze předpokládat, že skutečný výskyt akutní fáze infekční mononukleózy v populaci je mnohem větší, než počet pozitivních vzorků prokázaných laboratorními vyšetřovacími metodami. U tularémie a listeriózy je hodnocení výskytu ovlivněno malým počtem zachycených případů. I to může být důvod, proč se nepodařilo prokázat pravdivost výzkumné otázky č.1.

ZÁVĚR

Uzlinový syndrom je relativně běžný nález, na který je možné narazit v různých zdravotnických zařízeních a ordinacích. V převážné většině případů jde o banální nález, který nevyžaduje zvláštní pozornost lékaře. Naproti tomu můžeme vyšetřením této patologie diagnostikovat ranná stadia vážných nemocí, kdy je šance úspěšné léčby největší. Vztahuje se to i na infekční poškození organismu, kdy dosud nerozpoznaná infekce může způsobit diseminaci a systémové postižení.

Napsáním této bakalářské práce jsem se pokusila vytvořit základní přehled nejčastějších etiologických činitelů vyvolávajících lymfadenopatií. Lymfatická tkán hraje důležitou roli v obraně organismu. Mízní uzliny plní bariérovou funkci a brání šíření infekce. Důvody vzniku jejich zvětšení jsou různé a mohou mít jak infekční, tak neinfekční etiologii. Na prvně jmenovanou skupinu příčin byla zaměřena moje bakalářská práce. Tato klinicky významná problematika infekčního původu je velice rozsáhlá a její dokonalé popsání v rozsahu této práce není realizovatelné, protože přesahuje její formát, nicméně práce může posloužit k seznámení s danou patologií a zároveň může být zdrojem získání informací o nejčastějších infekčních agens způsobujících uzlinový syndrom.

SEZNAM LITERATURY

1. **HAVLÍK, Jiří.** *Infekční nemoci.* Praha : Galén, 1998. str. 221. ISBN 80-85824-90-6.
2. **MURRAY, Patrick R., ROSENTHAL, Ken S. a PFALLER, Ken S.** *Medical microbiology.* 8th edition. Philadelphia : Elsevier, 2015. str. 943. ISBN 978-0-323-29956-5.
3. **HURYCH, Jakub a ŠTÍCHA, Roman et al. ve spolupráci s Ústavem lékařské mikrobiologie 2. LF UK.** *Lékařská mikrobiologie - repetitorium.* 3. vydání. Praha : Triton, 2021. str. 637. ISBN 978-80-7553-976-2.
4. **VOTAVA, Miroslav a kol.** *Lékařská mikrobiologie speciální.* Brno : NEPTUN, 2003. str. 495. ISBN 80-902896-6-5.
5. **BEDNÁŘ, J., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J.** *Lékařská mikrobiologie.* Praha : Marvil, 1996. str. 558.
6. **VOTAVA, Miroslav a kol.** *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody.* Brno : NEPTUN, 2010. str. 495. ISBN 978-80-86850-04-8.
7. **HOŘEJŠÍ, Václav, BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, BRDLIČKA, Tomáš, ŠPÍŠEK, Radek.** *Základy imunologie.* 6., aktualizované vydání. Praha : TRITON, 2017. str. 297. ISBN 978-80-7553-250-3.
8. **KOLÁŘOVÁ, Libuše et al.** *Obecná a klinická mikrobiologie.* Praha : Galén, 2020. str. 441. ISBN 978-80-7492-477-4.
9. **BENEŠ, Jiří.** *Infekční lékařství.* Praha : Galén, 2009. str. 651. ISBN 978-80-7262-644-1.
10. **GÖPERTOVÁ, Dana, PAZDIORA, Petr, PETROUŠOVÁ, Lenka, DÁŇOVÁ, Jana.** *100 infekcí (epidemiologie pro praxi).* Praha : TRITON, 2015. str. 284. ISBN 978-80-7387-846-7.
11. **PAVELKA, Jan.** Infekční mononukleóza – racionální přístup. *Pediatric pro praxi.* 2014, 4.
12. **HENEBERG, Petr.** Záhada Burkittova lymfomu vyřešena. *Vesmír.* 2010, 10.
13. **KRÁL, Zdeněk.** Současné názory na léčbu Hodgkinova lymfomu. *Onkologie.* 2010, 4.

14. **KLEINEROVÁ, Jana.** Infekční mononukleóza. *Medicína pro praxi*. 2008, 5.
15. **JÍRA, Jindřich.** *Lékařská protozoologie Protozoální nemoci*. Praha : Galén, 2009. str. 567. ISBN 978-80-7262-38-5.
16. **MACHALA, Ladislav, KODYM, Petr, ČERNÝ, Rudolf.** Toxoplazmóza. *Interní medicína pro praxi*. 2005, 3.
17. **KOŘISTEK, Kamil.** *Parazitologie*. Olomouc : Palackého univerzita, 2015. str. 66. ISBN 978-80-244-4540-3.
18. **KLEMENTA, Viktor, KARÁSEK, David, KURAŠOVÁ, Ester.** Tularemie v kazuistikách. *Medicína pro praxi*. 2022, 19.
19. **GOERING, Richard V., DOCKRELL, Hazel M., ZUCKERMAN, Mark A., ROITT, Ivan M., CHIODINI, Peter L.** *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha : Triton, 2016. str. 568. ISBN 978-80-7387-928-0.
20. **JILICH, David, MACHALA, Ladislav.** Listeriόza. *Medicína pro praxi*. 2008, 5.
21. **FOLTÝNOVÁ, Soňa.** Listeriόza. *Pediatric pro praxi*. 2014, 15.
22. **OXOID CZ s.r.o.** Oxoid infectious mononucleosis kit. Brno : OXOID CZ s.r.o., 2008. DR0708.
23. **Příloha k pracovnímu návodu KF - COMPLEMENT set. Příloha k pracovnímu návodu KF - COMPLEMENT set.** 2011.
24. **KUDOVÁ, Jarmila.** Stanovení protilátek proti VCA EBV ve třídě IgG a IgM a stanovení protilátek proti EAD a EAR EBV ve třídě IgG v séru metodou nepřímé imunofluorescence. Plzeň : FN Plzeň, 2022.
25. —. Stanovení protilátek ve třídě IgG proti EBNA-1 v séru metodou EIA na analyzátoru DSX. Plzeň : FN Plzeň, 2022.
26. **TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.** Návod pro použití SmartEIA Toxoplasma IgM.
27. —. Návod pro použití SmartEIA Toxoplasma IgG.
28. —. Návod pro použití SmartEIA Toxoplasma IgA.

29. FAJFRLÍK, Karel. Stanovení celkových protilátek proti Toxoplasma gondii metodou komplementfixace (KFR). Plzeň : FN Plzeň, 2022.

30. Bioveta, a.s. Souprava k diagnostice Tularemie. 2016.

31. JANOUŠKOVCOVÁ, Helena. Bakteriologické vyšetření krve a jiných primárně sterilních tekutin automatizovaným kultivačním systémem. Plzeň : FN Pzeň, 2022.

32. —. Bakteriologické vyšetření mozkomíšního moku mikroskopicky a kultivačně. Plzeň : FN Plzeň, 2021.