



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Stanovení *Streptococcus pyogenes* z výtěru krku  
kultivačně a metodou imunoturbidimetrie**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**ZDRAVOTNÍ LABORANT**

**Autor:** Klára Smolová

**Vedoucí práce:** prim. MUDr. Věra Kůrková

České Budějovice 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Stanovení *Streptococcus pyogenes* z výtěru krku kultivačně a metodou imunoturbidimetrie jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2017 .....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala prim. MUDr. Věře Kůrkové za její odbornou pomoc, ochotu a čas, který věnovala tomu, aby mohla tato práce vzniknout. Dále bych ráda poděkovala celému týmu z Oddělení klinické mikrobiologie v Nemocnici Písek, a. s.. V neposlední řadě děkuji celé své rodině za podporu, zvláště pak Václavovi Procházkovi.

## **Stanovení *Streptococcus pyogenes* z výtěru krku kultivačně a metodou imunoturbidimetrie**

### **Abstrakt**

Včasný záchyt infekcí způsobených bakterií *Streptococcus pyogenes* je velmi důležitý, aby byla zahájena antibiotická léčba a zamezilo se tak vzniku tzv. pozdních následků streptokokových nákaz, mezi něž patří revmatická horečka a akutní glomerulonefritida.

Cílem práce je porovnat dvě metody používané k vyšetření výtěru z krku podezřelého z přítomnosti *Streptococcus pyogenes* prováděných v Nemocnici Písek, a. s.. Jednou z metod je kultivace, prováděná na Oddělení klinické mikrobiologie a druhou z nich je metoda QuikRead go Strep A, která je využívána v dětské ambulanci. Hlavní výhodou metody QuikRead go Strep A je rychlost, s jakou má lékař k dispozici výsledek vyšetření a také skutečnost, že metoda je prováděna přímo v ambulanci. Ovšem metoda QuikRead go Strep A má oproti kultivaci svá omezení. Nedokáže zachytit případného jiného původce onemocnění, nelze následně provádět určení citlivosti na antibiotika a spolehlivost je udávána jako 93 %. Zvláště proto jsem se zaměřila na porovnání výsledků vzorků vyšetřených oběma z metod. Celkem bylo ve sledovaném období, tedy v roce 2016, vyšetřeno pomocí metody QuikRead go Strep A 218 vzorků. 143 z nich bylo následně přezkoumáno kultivačně. Celkem u 62,9 % vzorků došlo ke shodnému výsledku oběma sledovanými metodami. V tomto případě se metoda QuikRead go Strep A ukázala být jako spolehlivější v případě negativního výsledku testu. Shodnému výsledku, tedy neprokázání *Streptococcus pyogenes* ve vzorku, bylo dosaženo u 94,7 % vzorků, zatímco v situaci, kdy byl vzorek metodou QuikRead go Strep A určen jako pozitivní, dospělo se kultivačně ke stejnému výsledku pouze u 26,9 % vzorků. Vysoká chybovost mohla být v tomto případě způsobena nesprávným odběrem vzorku pro imunoturbidimetrické vyšetření. V návodu k metodě je upozorňováno na skutečnost, že v případě, kdy se odběrový tampón dotkne jazyka, dásně nebo tváře, může následně dojít k falešně pozitivnímu výsledku. Proto by shoda mezi oběma sledovanými metodami mohla být jiná, pokud bychom vzorky získali od lépe spolupracujících dospělých pacientů.

**Klíčová slova**

*Streptococcus pyogenes*; kultivace; imunoturbidimetrie; výtěr z krku; pozdní následky streptokokových nákaz

## **Determination of *Streptococcus pyogenes* in throat swab by cultivation and immunoturbidimetry metode**

### **Abstract**

Early identification of infections caused by bacteria *Streptococcus pyogenes* is very important in order to start antibiotic treatment and to prevent from so-called late consequences of streptococcal infections, including rheumatic fever and acute glomerulonephritis.

Aim of my thesis is to compare two methods which are used for examination of throat swab specimen in Písek Hospital, INC. when presence of *Streptococcus pyogenes* is expected. The first method used by The Department of Clinical Microbiology is a cultivation, the second one is a method used by children's emergency. Main advantage of QuikRead go Strep A method is the speed of availability of the examination result and also the fact that it can be performed directly in the consulting room. However, compared to the cultivation method, QuikRead go Strep A method has its limits. It is unable to detect any other cause of the disease, it is not possible to use it subsequently to determine antibiotic sensibility and its reliability is reported as 93 %. That is why I concentrated on comparison of results of samples examined by both of the methods. In targeted period, i.e. year 2016, there were 218 samples examined by QuikRead go Strep A method, 143 of them were subsequently re-examined by the method of cultivation. A total of 62,9 % of the samples showed a consistent result with both methods. The QuikRead go Strep A method proved to be more reliable in case of a negative test result. The same result, e.i. negative presence of *Streptococcus pyogenes* in the sample, was measured at 94,7 % of samples, on the other hand, when a sample was detected as positive by QuikRead go Strep A method, match with cultivation method was only in 26,9 % of samples. A high error rate could have been caused by incorrect sampling for immunoturbidimetric examination. The method guide warns to the fact that if a swab touches the tongue, gums or cheeks, then a false positive result may occur. Therefore, the match between the two methods could be different if we obtained the samples of more cooperative adult patients.

**Key words**

*Streptococcus pyogenes*; cultivation; immunoturbidimetry; throat swab specimen collection; late consequences of streptococcal infection

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 Rod <i>Streptococcus</i></b> .....	<b>12</b>
1.1.1 Beta-hemolytické (pyogenní) streptokoky .....	12
1.1.1.1 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	13
1.1.1.1.1 Morfologie .....	13
1.1.1.1.2 Fyziologie .....	13
1.1.1.1.3 Antigenní struktura.....	14
1.1.1.1.4 Patogeneze.....	14
1.1.1.1.5 Imunita.....	16
1.1.1.1.6 Patogenita.....	16
1.1.1.1.7 Terapie .....	18
1.1.1.1.8 Laboratorní průkaz .....	19
<b>1.2 Kultivace</b> .....	<b>20</b>
1.2.1 Kultivace <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	22
1.2.1.1 Krevní agar .....	22
<b>1.3 Imunoturbidimetrie</b> .....	<b>23</b>
<b>2 CÍL PRÁCE, HYPOTÉZY</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 Cíle práce</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2 Hypotézy</b> .....	<b>26</b>
<b>3 METODIKA</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Kultivace</b> .....	<b>27</b>
3.1.1 Princip metody.....	27
3.1.2 Pracovní postup .....	27
3.1.2.1 PYR test (PYRAtest).....	28
3.1.2.1.1 Princip testu .....	28
3.1.2.1.2 Potřeby pro provedení PYR testu .....	28
3.1.2.1.3 Pracovní postup.....	29
3.1.2.2 Latexová aglutinace (Protex <sup>TM</sup> Streptococcal Grouping Latex Kit).....	29
3.1.2.2.1 Princip testu .....	29
3.1.2.2.2 Potřeby pro provedení latexové aglutinace .....	29
3.1.2.2.3 Pracovní postup.....	30
3.1.2.3 Stanovení citlivosti na antibiotika (disková difúzní metoda).....	31
3.1.2.3.1 Princip testu .....	31
3.1.2.3.2 Potřeby pro provedení testu.....	31
3.1.2.3.3 Pracovní postup.....	31
<b>3.2 Imunoturbidimetrie (QuikRead go Strep A)</b> .....	<b>32</b>
3.2.1 Princip testu.....	32
3.2.2 Potřeby pro provedení testu .....	32



3.2.3	Pracovní postup .....	33
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>66</b>

## Úvod

*Streptococcus pyogenes* je fakultativně anaerobní grampozitivní katalasanegativní kok. Tuto bakterii řadíme mezi beta-hemolytické streptokoky. Při jejím růstu na krevním agaru tedy dochází k beta-hemolýze, kterou pozorujeme jako projasnění půdy v okolí bakteriálních kolonií. Podle Lancefieldové náleží *Streptococcus pyogenes* do serologické skupiny A.

*S. pyogenes* je pro člověka primárně patogenní. Může způsobovat infekce respiračního traktu, které převažují v mírném pásu, v teplých oblastech pak zapříčiňuje častěji infekce kožní. *Streptococcus pyogenes* je původcem faryngitid, spály, infekcí kůže a podkoží (pyoderma, erysipel), systémových infekcí, streptokokového toxického šoku a poststreptokokových následků.

Hlavním faktorem virulence *Str. pyogenes* je protein M, který se nachází na povrchu bakterie. Lidské tělo se proti streptokokovým nákazám brání především tvorbou protilátek proti M-proteinu. Po naze bakterii *Streptococcus pyogenes* může dojít k tzv. pozdním následkům streptokokových naze. Řadíme mezi ně revmatickou horečku a akutní glomerulonefritidu.

M-protein na povrchu *Str. pyogenes* je velmi podobný strukturám tvořících srdeční chlopně, kloubní výstelku a nervové buňky. Protilátky tvořené imunitním systémem proti M-proteinu na povrchu bakterie mohou tedy napadat i vlastní buňky srdce, kloubů a nervů. Toto je mechanismus vzniku revmatické horečky. Onemocnění často vede k deformaci srdečních chlopní a následnému postupnému rozvoji těžké srdeční vady. Dále se objevuje zánět kloubů podobný revmatoidní artritidě. Postižení kloubů je ovšem dočasné a nezanechává následky. Zasaženy mohou být i nervové buňky.

Akutní glomerulonefritida je zdá se oproti revmatické horečce způsobena usazováním imunitních komplexů v glomerulech. U většiny nemocných nedochází k výraznější poruše renálních funkcí.

Revmatická horečka i akutní glomerulonefritida nejsou v dnešní době ve vyspělých zemích příliš častým problémem a jejich výskyt stále klesá díky včasné léčbě streptokokových infekcí antibiotiky a hygienickým standardům. Včas zahájená léčba může zabránit vzniku imunitní reakce proti streptokokům a současně tak zamezit

rozvoji pozdních následků streptokokových nákaz. Proto je velmi důležitá rychlá diagnostika infekcí způsobených *Streptococcus pyogenes*.

V práci se zabývám stanovením *Streptococcus pyogenes* imunoturbidimetrickou metodou prováděnou v dětské ambulanci v Nemocnici Písek, a. s. a metodou kultivační prováděnou na Oddělení klinické mikrobiologie v Nemocnici Písek, a. s.. Obě z metod vzájemně porovnávám a sleduji zejména jejich shodu ve výsledcích vyšetření prováděných z výtěru krku odebraných v roce 2016 pacientům dětské ambulance v Nemocnici Písek, a. s. podezřelých z infekce bakterií *Streptococcus pyogenes*.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Rod *Streptococcus*

Do rodu *streptococcus*, jehož jméno je odvozeno od řeckého *streptos* (řetěz), náleží fakultativně anaerobní gram pozitivní katalasanegativní koky, které se řadí do dvojic až řetízků. Jejich kolonie jsou někdy i na obohacených půdách velmi drobné. Až na výjimky nerostou při 10 ani při 45°C, ani v přítomnosti 6,5% NaCl nebo 40% žlučových solí, ani při pH vyšším než 9, nehydrolyzují eskulin a nejsou pohyblivé. Streptokoky jsou citlivé na vankomycin a mnohé z nich na krevním agaru hemolyzují. Mezi streptokoky řadíme jak příslušníky normální mikroflóry sliznic lidí a zvířat tak i druhy obligátně patogenní. (Votava, 2003)

Streptokoky můžeme dělit podle hemolýzy na krevním agaru na  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Alfa-streptokoky pozměňují krevní barvivo a vytvářejí kolem kolonií viridaci. Podstatou viridace (lat. *viridis*, zelený) je změna krevního barviva na zelená verdoglobin. Beta-hemolýza se projevuje odbarvením erytrocytů. Pokud dojde k projasnění půdy v okolí kolonie, označujeme hemolýzu jako úplnou, pokud zůstává půda v zóně hemolýzy zakalená, nazýváme tuto hemolýzu neúplnou. Gama-streptokoky nemají kolem kolonie dvorec žádný. Důležitým kritériem klasifikace streptokoků je přítomnost polysacharidu C ve stěně. Na základě jeho antigenních vlastností rozlišujeme skupiny A až U. Některé streptokoky tento polysacharid nemají, jsou to tzv. viridující streptokoky. (Votava, 2003; Schindler, 2014)

### 1.1.1 *Beta-hemolytické (pyogenní) streptokoky*

Do skupiny beta-hemolytických neboli pyogenních streptokoků důležitých v humánní medicíně patří především druhy *S. pyogenes* a *S. agalactiae*. *S. agalactiae* je nejdůležitějším původcem novorozeneckých meningitid a sepsí. Pro člověka jsou také patogenní *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* a druhy skupiny *Streptococcus anginosus*. *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* dělíme na kmeny, z nichž většinu řadíme sérologicky do skupiny C dle Lancefieldové, mnohé do skupiny G, vzácně i A a L. Ve skupině *Streptococcus anginosus* dále rozeznáváme tři druhy, z nichž jeden má dva poddruhy: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* ssp. *constellatus*, *Streptococcus constellatus* ssp. *pharyngis* a *Streptococcus intermedius*. Mezi druhy primárně zvířecí, které ale mohou vyvolat onemocnění i u člověka řadíme

*S. equi* spp. *zooepidemicus*, *Str. canis*, *Streptococcus porcinus* a *Streptococcus iniae*. Pouze pro zvířata jsou patogenní *Streptococcus equi* ssp. *equi*, *Streptococcus phocae* a *Streptococcus didelphis*. (Votava, 2003)

### 1.1.1.1 *Streptococcus pyogenes*

V doslovném překladu znamená pyogenes tvořící hnis, z řeckého pyón=hnis a gennaó=tvořím, plodím. *Str. pyogenes* je nejdůležitějším mikroorganismem z  $\beta$ -streptokoků. Podle Lancefieldové náleží do sérologické skupiny A. Taxonomické zařazení *Str. pyogenes* je uvedeno v tabulce č. 1. (Klaban, 2005)

*Str. pyogenes* je primárně patogenní pro člověka a člověk je jediným přirozeným zdrojem infekce. Infekce jím vyvolané se vyskytují po celém světě, v mírném pásmu však převažují infekce respiračního traktu, v teplých oblastech jsou častější infekce kožní. *Str. pyogenes* je původcem faryngitid, spály, infekcí kůže a podkoží (pyoderma, erysipel), systémových infekcí, streptokokového toxického šoku a poststreptokokových následků. (Bednář et al., 1996; Kuo et al., 2017)

**Tabulka č. 1: Taxonomické zařazení *Streptococcus pyogenes***

Doména	<i>Bacteria</i>
Kmen	<i>Firmicutes</i>
Třída	<i>Bacilli</i>
Řád	<i>Bacillales</i>
Čeleď	<i>Streptococcaceae</i>
Rod	<i>Streptococcus</i>
Druh	<i>Streptococcus pyogenes</i>

(Votava, 2005)

#### 1.1.1.1.1 Morfologie

Jde o grampozitivní koky, které v patologickém materiálu a v mladých kulturách v tekutých půdách zůstávají seřazeny do řetízků složených z několika až několika desítek jedinců. Velmi dlouhé řetízky se tvoří po delší inkubaci v tekuté půdě. (Bednář et al., 1996)

#### 1.1.1.1.2 Fyziologie

Jako většina streptokoků je i *Str. pyogenes* fakultativní anaerob (za přítomnosti kyslíku rostou lépe, ale mohou růst i bez jeho přítomnosti), katalasa i oxidasanegativní.

Hlavním produktem jeho metabolismu je kyselina mléčná. Zahubí ho teplota 60 °C během 30 minut, ale poměrně dobře snáší vyschnutí. (Votava, 2003; Horanová, 2013)

#### **1.1.1.1.3 Antigenní struktura**

Buňky *Str. pyogenes* obsahují skupinově specifický polysacharid C, na jehož podkladě ho řadíme do skupiny A podle Lancefieldové. Z bílkovinných povrchových antigenů jsou významné proteiny M, T a také proteiny blízké M-proteinu. M-protein je vláknitá struktura vyčnívající z bakteriální stěny. Vlákno je složeno ze dvou spirálovitě svinutých řetězců, které jsou ukotveny v bakteriální stěně svými karboxyterminálními konci. Regulační faktor komplementu H a fibrinogen se váže na místa na vlákně M-proteinu. Volný aminoterminální konec M-proteinu je svým složením velmi variabilní. Na podkladě jeho antigenní stavby rozeznáváme více než 100 serotypů, vůči nimž existuje typově specifická imunita daná přítomností opsonizačních protilátek. M-protein je tedy zároveň hlavním protekčním antigenem. Některé M-serotypy vyvolávají spíše infekce nosohltanu, jiné infekce kůže. Některé pak mají vztah k revmatické horečce a jiné k akutní glomerulonefritidě. Kmeny, které nelze blíže určit na podkladě M-proteinu, typizujeme pomocí proteinu blízkému proteinu M, zvaného sérový opacitní faktor. Je to lipoproteinasa působící kalení (opacitu) séra. Protilátky proti sérovému opacitnímu faktoru jsou typově specifické a korelují s M-typem. Na základě antigenní struktury proteinu T rozeznáváme dalších 25 typů, které mají rovněž určitý vztah k M-typům. Typizace je důležitá z epidemiologického hlediska při vyšetřování výskytu streptokokových onemocnění, kde nelze určit M-typ. Nejmodernějšími typizačními postupy jsou postupy molekulárně biologické, kdy se na základě analýzy nukleotidové sekvence genů pro protein M a proteiny jemu blízké rozeznává na 120 emm-typů a další desítky emm-like typů. (Votava, 2003)

#### **1.1.1.1.4 Patogeneze**

Hlavním faktorem virulence *S. pyogenes* je protein M. Kmeny bez M-proteinu jsou nevirulentní. M-protein umožňuje adhezi bakterie na povrch sliznic a po průniku ji chrání před fagocytózou. U některých typů M-proteinu byla prokázána podobnost antigenní struktury s determinantami bazální membrány lidských glomerulů. Typy, které se spojují se vznikem revmatické horečky, se označují jako revmatogenní. Kmeny bohaté na M-protein dokáží odolávat fagocytóze a nitrobuněčnému usmrcení uvnitř polymorfonukleárních leukocytů. Poměrná odolnost k fagocytóze se vysvětluje vazbou

regulačního faktoru H na M-protein, což zamezí ukládání C3b na povrch bakterie a tím potlačí aktivaci komplementu alternativní cestou. Stejný důsledek má vazba fibrinogenu na protein M. Vůči epitelíím sliznic a kůže se chová protein M zcela opačně. Působí zde jako adhezín, který umožňuje přilnutí streptokoka na povrch epitelie, a internalizín, s jehož pomocí se streptokoky dostanou do nitra buňky. M-protein se chová také jako invazin a pomáhá pronikat tkání. Adhezivní a invazivní účinky byly ovšem popsány u řady dalších streptokokových faktorů. Proteiny blízké proteinu M působí antifagocytárně. I ony dovedou vázat nejen fibrinogen ale i jiné plazmatické bílkoviny, například vážou Fc-oblast imunoglobulin G (IgG) a imunoglobulin A (IgA), čímž brání řádné opsonizační funkci protilátek. Důležitým faktorem virulence pyogenních streptokoků je pouzdro z kyseliny hyaluronové, které je téměř neimunogenní, snad proto, že ho imunitní systém pokládá za tělu vlastní strukturu, protože kyselina hyaluronová je normální součástí pojivové tkáně savců. Svojí přítomností tedy brání opsonizaci a přístupu fagocytů k opsoninům na povrchu streptokoka. (Bednář et al., 1996; Votava, 2003)

Z extracelulárních faktorů virulence jsou nejznámější hemolyziny. Streptolysin O patří do rodiny oxigenlabilních hemolyzinů, je účinný pouze v redukované formě, kdy rozpouští erythrocyty. Při infekci se proti němu vytváří protilátky, antistreptolysin O (ASLO), jehož koncentrace v krvi indikuje závažnost infekce. Streptolysin S je oxygenstabilní a neantigení. Na krevním agaru vyvolává zónu úplné hemolýzy. K toxickým enzymům patří také streptokinasa a enolasa, které vážou tkáňový plazminogen. Na povrchu bakterie tak vzniká plasmin, ten aktivuje metaloproteinasy a kolagenasy, což bakteriím umožňuje překonávat překážky dané stavbou tkání. Podobným faktorem, který usnadňuje průnik bakterií tkáněmi, je hyaluronidasa, štěpící kyselinu hyaluronovou, složku mezibuněčné tmelové substance. Deoxyribonukleasa B má spíše diagnostický význam jako antigen k průkazu protilátky. Enzym C5a-peptidasa štěpí C5a fragment komplementu a inhibuje tak chemotaxi leukocytů. (Votava, 2003; Schindler, 2014)

Mnohé kmeny také tvoří streptokokové pyrogenní exotoxiny (Spe). Dříve se exotoxiny SpeA a SpeC nazývaly spálový nebo také erytrogenní Dickův toxin. Spe působí jako superantigeny, to znamená, že se spojí molekulu MHC II na antigen prezentujících buňkách s receptorem T-buněk. Tím dojde k nespecifické aktivaci spousty T-buněk a uvolnění přemíry cytokinů. Následkem je horečka, aktivace komplementu a systémů

srážlivosti a fibrinolýzy. Výsledkem je syndrom streptokokového toxického šoku. Streptokokových superantigenů stále přibývá, ve značení jsme u písmene M (SpeM) a kromě toho je známý například streptokokový superantigen SSA a streptokokové mitogenní exotoxiny SMEZ a SMEZ-2. (Votava, 2003)

#### **1.1.1.1.5 Imunita**

Obranou proti streptokokovým nákazám jsou především protilátky proti M-proteinu. Protilátky IgA zabraňují přilnutí bakterií na epitelie a kolonizaci sliznic. Protilátky IgG opsonizují a brání tak invazi do tkání a množení streptokoků v krvi. Proti dalším povrchovým molekulám a proti C5a-peptidase byl také prokázán ochranný účinek. Protilátky proti streptokokovým pyrogenním exotoxinům A, B a C chrání organismus pouze proti vzniku spálové vyrážky, nikoli však proti vzniku anginy. T-buněčná imunita se zdá mít také částečnou ochrannou roli. Streptokokovou anginou lze onemocnět opakovaně, a to i po infekci stejným typem. Imunita je v tomto případě přísně typově specifická a proto byla-li antibiotická léčba zahájena včas, protilátky proti M-proteinu se nestačí vytvořit. (Votava, 2003)

#### **1.1.1.1.6 Patogenita**

*Streptococcus pyogenes* je častým původcem angin, spály, impetiga, růže (erysipelu), sepsí a dalších hnisavých procesů a také tzv. pozdních následků těchto nákaz. (Ryšková, 2007)

Nejběžnějším streptokokovým hnisavým onemocněním je akutní tonsilofaryngitida, označovaná těž jako angina. Toto onemocnění je ve většině případů způsobeno virem, pouze asi v 5-30 % jsou jeho původcem bakterie, mezi nimi *Str. pyogenes*. Obávanou, ale v dnešní době a v naší zemi ne příliš častou komplikací tohoto onemocnění, jsou imunogenní následky streptokokové infekce. Angina se projevuje vysokou horečkou a v důsledku zánětu mandlí také bolestí v krku. Velmi časté je toto onemocnění zejména u dětí a mladých dospělých. Pokud kmen produkuje pyrogenní exotoxiny, k příznakům anginy se přidávají další. Mluvíme pak o spále, která je navíc provázena výsevem spálového exantému. Vyrážka se tvoří v axilách, podbřišku a tříselné krajině. Dalšími příznaky jsou malé bílé lesklé pupínky na ušních boltečích a v okolí nehtového lůžka. Spála je onemocnění časté pro děti školního a předškolního věku. Zdrojem nákazy je nemocný člověk nebo nosič streptokoka. Po začátku antibiotické léčby je nemocný člověk infekční ještě asi 1-2 dny po jejím zahájení. Přenos infekce probíhá především



kapénkami, méně často pak nepřímo, vzduchem nebo dokonce i kapénkami kontaminovanými předměty. V literatuře se uvádí i možnost nákazy cestou alimentární, např. kontaminovaným mlékem. Komplikace anginy a spály mohou být hnisavé (např. otitis media), vzácně toxické (syndrom streptokokového toxického šoku), případně mohou vznikat tzv. pozdní následky. Syndrom streptokokového toxického šoku se klinicky projevuje vysokou teplotou, vyrážkou, poklesem krevního tlaku a pozdějším olupováním pokožky na dlaních a ploskách. Mezi další příznaky patří zvracení, průjem, bolesti svalů, poruchy centrální nervové soustavy (CNS) a další. Výskyt těchto komplikací není příliš častý, avšak smrtnost i v našich podmínkách je až 50%. (Göpfertová, 2002; Křížová a Petráš, 2012; Kuchynková et al., 2012)

Hnisavé kožní infekce jsou obvykle vyvolávány jinými M-serotypy. Vyskytují se častěji v létě a jsou vysoce nakažlivé. Jako jejich pozdní následek se může objevit akutní glomerulonefritida. Jednou z těchto infekcí je impetigo, povrchová infekce kůže, která se nejčastěji objevuje u malých dětí. Nemoc se projevuje hnisem naplněnými nebo bolestivými puchýřky a zasychajícími strupy. Streptokoky mohou po narušení pokožky pronikat hlouběji a vzniká pak zánět zvaný růže (erysipelas). Nejčastěji se objevuje na obličeji a dolních končetinách. Cellulitis je zánět podkoží. (Votava, 2003; Frankel, 2006; Bolognia et al., 2012)

Mezi onemocnění vyvolávaná streptokokem řadíme i nekrotizující fasciitis, myonecrosis, myositis, dále pneumonii či meningitidu. Při některých streptokokových infekcích hrozí vysoké nebezpečí vzniku sepse. (Votava, 2003)

Revmatická horečka a akutní glomerulonefritida jsou tzv. pozdními následky streptokokových nákaz. K tomu, aby se projevil, je nezbytná předchozí infekce způsobená *Str. pyogenes*, genetická dispozice a také vliv prostředí umožňující opakovanou expozici vůči streptokokovým infekcím. (Votava, 2003)

Revmatická horečka je onemocnění často vedoucí k deformaci srdečních chlopní a k postupnému rozvoji těžké srdeční vady, vyžadující náhradu chlopní. Objevuje se také zánět kloubů podobný revmatoidní artritidě, odtud také název revmatická horečka. Postižení kloubů je ovšem dočasné a nezanechává následky. V akutním stádiu mohou být zasaženy i nervové buňky. Revmatická horečka se častěji objevuje po infekci některými serotypy, tzv. „revmatoidními“ mezi něž patří M1, 3, 5, 16 a 18. M-protein obsažený na povrchu *Streptococcus pyogenes* je velmi podobný strukturám

v tkáních tvořících srdeční chlopně, kloubní výstelku a nervové buňky. Pokud je mikrob, který se dostal do organismu, rozpoznán imunitním systémem jako cizí, následně tvořené protilátky se neobráťí jen proti bakterii, ale i proti vlastním buňkám srdce, kloubů a nervů. S rozšířením používání antibiotik na streptokokové infekce bylo toto onemocnění prakticky vymýceno z rozvojových zemí. (Shoenfeld et al., 2007; Martins et al., 2017 Paotonu et al., 2017)

Akutní glomerulonefritida se dostavuje po infekci tzv. nefritogenními typy streptokoků, z nichž typy M2, 49, 55, 56 a další vyvolávají spíše pyodermie a typy M1, 4, 12 a 25 anginy. Infekce vedoucí k rozvoji tohoto onemocnění mohou tedy vycházet z tonzil, nosohltanu i kůže. Nefritida vzniká 1-2 týdny po tonzilitidě. Může se vyvinout tzv. akutní nefritický syndrom, kdy u nemocného pozorujeme otoky tváří a víček spolu s makroskopickou hematurii, oligourii a zvýšený krevní tlak. Po 4-7 dnech dochází obvykle k vzestupu diurézy, otoky mizí a i ostatní příznaky se normalizují. Přetrvává ovšem mikroskopická hematurie. Časté jsou i příznaky jako bolesti v bedrech, únava, nauzea a další. Zdá se, že chorobné změny jsou u poststreptokokové glomerulonefritidy vyvolány usazováním imunitních komplexů v glomerulech. U většiny nemocných nedochází dlouhodobě k výraznější poruše renálních funkcí. Výskyt akutní glomerulonefritidy ve vyspělých zemích stále klesá díky zvýšeným hygienickým standardům a včasné léčbě streptokokových infekcí antibiotiky. (Tesař et al., 2015)

#### ***1.1.1.1.7 Terapie***

Důležitým cílem terapie je zabránit vzniku revmatické horečky, a proto jsou podávána antibiotika. Antibiotická terapie nedokáže zabránit rozvoji akutní glomerulonefritidy, ale zabrání místním komplikacím. *S. pyogenes* je citlivý na penicilin, klindamycin, cefalosporiny a makrolidy. Lékem volby je penicilin. Antibiotika podáváme po dobu deseti dnů. Včas zahájená léčba může zabránit vzniku imunitní reakce vůči streptokokům a současně zamezí vzniku pozdních následků. Někdy ovšem léčba penicilinem selže. V případě těžkých nákaz mohou streptokoky ve tkáni dosáhnout hladin, při nichž se přestávají množit a tvořit penicilin vázající proteiny, díky čemuž vnímavost k účinku penicilinu významně klesne. Další možnou příčinou selhání penicilinu je schopnost streptokoků přežívat uvnitř epitelii dýchacího traktu, do nichž penicilin neproniká. V případě, že léčený pacient nedodrží dávkovací

schéma, antibiotika jsou rovněž neúčinná. (Votava, 2003; Vlček a Fialová, 2014; Kuchynková, 2015)

#### ***1.1.1.1.8 Laboratorní průkaz***

Pro bezchybné vyhodnocení výsledků v laboratoři je zásadní správné provedení odběru biologického materiálu. Výtěr z krku by měl být proveden na lačno, nejlépe před zubní hygienou. Odběry je doporučeno provádět před započítím antibiotické terapie, pokud již pacient v době odběru nějaké antimikrobní látky užívá, je vhodné zapsat tuto informaci na žádanku. Pokud se nemůže výtěr doručit do laboratoře v den odběru, lze jej uchovávat v transportní půdě do 24 hodin dle druhu materiálu při pokojové či chladničkové teplotě. Výtěr bez transportní půdy na suchém tampónu se musí zpracovat do 2 hodin po odběru. Odběr provádíme následujícím způsobem. Odběrovou soupravu označíme nejlépe před odběrem. Vyzveme pacienta, aby otevřel ústa. Špachtlí přidržíme jazyk tak, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku ústní flórou. Sterilním vatovým tampónem se otáčivým pohybem setře povrch obou mandlí nebo patrových oblouků. Vatový tampón se zanoří do odběrové soupravy s transportní půdou. Pokyny pro odběr biologického materiálu jsou také uvedeny v laboratorních příručkách jednotlivých laboratoří. (*Laboratorní příručka Oddělení klinické mikrobiologie*, 2016)

Nejspolehlivější metodou je kultivační záchyt z výtěru z tonzil a ze zadní stěny hltanu na krevním agaru (viz dále) s následnou identifikací druhu dalšími testy (PYR test, průkaz skupinového antigenu A latexovou aglutinací). Další možností je průkaz antigenů skupiny A přímo z výtěru. Spolehnout se na něj však můžeme jen při vysokém počtu streptokoků v hrdle. Výhodou je, že zůstává pozitivní i v případě nasazení antibiotické léčby. Test by měl být provázen odebráním dalšího výtěru ke kultivaci, zvláště při negativním výsledku. Z nepřímých diagnostických metod využíváme průkaz protilátek proti streptokokovým antigenům, především proti streptolyzinu O (ASLO) a proti deoxyribonukleáze B. Nepřímá diagnostika se uplatňuje především při hodnocení rizika vzniku pozdních následků a jejich diagnostice. Zjištění protilátek ovšem není nijak přínosné pro diagnostiku akutního onemocnění. Protilátky potvrzující prodělanou streptokokovou infekci se začínají objevovat asi týden po infekci. Nejvyšších hladin dosahují za 3-6 týdnů a zvýšené mohou přetrvávat až několik měsíců. (Bednář et al., 1996; Kuchynkový, 2015)

## 1.2 Kultivace

Kultivace je jednou z metod přímého průkazu původce onemocnění. Cílem je izolovat původce v čisté kultuře pro jeho identifikaci nebo další charakterizaci. Metoda spočívá v pěstování mikroorganismů za laboratorních podmínek. Podle toho, za jakých podmínek kultivace probíhá, ji můžeme dělit na kontinuální, semikontinuální, statickou a submerzní. Kultivace kontinuální nebo také průtoková (souvislá, neustále probíhající) je způsobem kultivace mikrobů, kdy do kultivační nádoby nepřetržitě přitéká čerstvé médium a současně část média s mikroorganismy odtéká. Kultivace semikontinuální spočívá v periodickém odebrání části objemu kultury s mikroorganismy a doplňováním stejného objemu tekuté půdy zpět. V současnosti je tento způsob většinou nahrazen kontinuální kultivací. Statická neboli stacionární kultivace probíhá v klidovém, nehybném prostředí. Řadíme sem růst mikrobiálních kolonií na pevných půdách v Petriho miskách, ale probíhá i v kontaminovaných potravinách, pokud poskytuje příznivé podmínky pro množení mikrobů. Kultivací submerzní rozumíme kultivaci hloubkovou. Pokud tedy např. Erlenmayerovu baňku s vhodným médiem naočkujeme bakteriální kulturou, uzavřeme a pak nádobou stále pohybujeme, jde o submerzní kultivaci. Kultivaci označujeme jako submerzní i v případě, že kultivační nádoba je sice v klidu, ale vháníme do ní nepřetržitě sterilní vzduch, kterým se obsah neustále promíchává. Tento způsob kultivace se v průmyslovém měřítku využívá zejména ve fermentačních tancích. Přítomné mikroorganismy tak efektivněji využívají dostupné živiny, a proto se intenzivněji množí a dosáhneme i většího konečného nárůstu biomasy buněk. Průmyslově se využívá např. při výrobě antibiotik. (Klaban, 2005; Melter a Malmgren, 2014)

Abychom docílili růstu a množení bakterií *in vitro*, musíme zabezpečit řadu podmínek. Patří k nim například dostatek vody, dostatek živin a zdrojů energie, vhodné složení atmosféry, optimální teplota a pH, sterilita prostředí a jeho ochrana před kontaminací. Tyto podmínky jsou splněny při pěstování bakterií ve vhodných kultivačních půdách (médiích) inkubovaných při optimální teplotě a v optimální atmosféře. Optimální teplota pro většinu lékařsky důležitých bakterií je 37 °C. Docílíme jí v biologických termostatech (inkubátorech). Vyhřívaný prostor zvlhčujeme odpařováním vody. Pro většinu patogenních mikrobů je vyhovující běžné složení atmosféry, avšak některé vyžadují atmosféru se zvýšenou tensí CO<sub>2</sub>, jiným atmosféra se zvýšenou tensí CO<sub>2</sub> přinejmenším vyhovuje. K těmto účelům slouží termostaty s řízeným složením

atmosféry. K pěstování anaerobních bakterií se používají tzv. anaerostaty. Jedná se o hermeticky uzavíratelné nádoby, do nichž lze umístit přibližně deset Petriho misek. (Votava, 2005)

Kultivační půdy můžeme dělit dle různých kritérií. Jedním z nich je složení, kdy rozlišujeme půdy přirozené a syntetické. Většina půd užívaných v lékařské mikrobiologii patří mezi půdy přirozené (komplexní). K jejich přípravě se používají buď hotové přírodní produkty či komponenty, které se mohou z těchto produktů připravit. Nevýhodou je skutečnost, že neznáme jejich přesné chemické složení a mohou se tak ve svém složení a vlastnostech odlišovat v závislosti na konkrétním výrobci. Média syntetická (definovaná) jsou naproti tomu sestavena z chemicky definovaných sloučenin a jejich složení je tedy přesně známé. Podle konzistence rozeznáváme půdy tekuté a pevné. Výhodou tekutých půd je snadný přístup vody a živin k množícím se mikrobům, vyrůstají v nich proto snáze i z malého, respektive starého či poškozeného inokula. Nevýhodou tekutých půd je skutečnost, že růst mikrobů se v nich obvykle projeví zakalením, vzácněji sedimentem nebo blankou. Ze zákalu pak nelze určit, zda pomnožené mikroby představují čistou kulturu, nebo zda se jedná o jejich směs. Prakticky všechny pevné půdy se připravují ztužením základu (většinou bujonového) přidáním 1-2%, výjimečně až 5% agaru. Agar je směs polysacharidů získaných z rudých mořských řas a není žádnou bakterií významnou v lékařské mikrobiologii využíván jako zdroj živin. Slouží jen jako gelifikační přísada umožňující přípravu pevných kultivačních půd. Agarové půdy se vylévají do Petriho misek. V případě, že se agarová půda vlije do zkumavek, které se ponechají v šikmé poloze, dostaneme po zatuhnutí tzv. šikmé agary. Výhodou pevných půd je možnost pěstovat na nich mikroby v izolovaných koloniích. Opakovaným přenosem buněk z kolonie a jejich rozočkováním na povrchu nové půdy docílíme toho, že mikroby porostou v navzájem od sebe dobře izolovaných koloniích a tím získáme čistou kulturu příslušného mikroba. Velikost, vzhled a další vlastnosti kolonie jsou poměrně charakteristické pro určité mikroby a mohou tak sloužit k jejich předběžnému rozeznávání. Hodnotíme znaky jako velikost, tvar, profil, okraje, povrch, transparentci a barvu kolonie, změny v okolí, konzistenci a zápach. Podle složení a účelu, k němuž kultivační půdy používáme je lze dělit na půdy základní, obohacené, selektivní, diagnostické, selektivně diagnostické, půdy k anaerobní kultivaci, půdy k antibiotickým

zkouškám a ke stanovení účinných látek, půdy k uchování kultur a půdy transportní. (Klaban, 1999; Votava, 2005)

### **1.2.1 Kultivace *Streptococcus pyogenes***

Kultivace je nejspolehlivější metodou jak prokázat *S. pyogenes* ve výtěru z krku. *S. pyogenes* je kultivačně poměrně náročný. Vyžaduje půdy obohacené sérem či krví. Na obyčejném živném agaru a v živném bujónu roste velmi špatně. V tekutých půdách vytváří „krupici“. Půda nad ním může být zcela čirá. Roztěr provádíme na standardní krevní agar. Inkubujeme při 37 °C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>, odečet provádíme za 24 hodin. *S. pyogenes* tvoří na krevním agaru drobné kolonie, většinou lesklé, kolem 0,5 mm v průměru. Kolonie bývají obklopeny dobře ohraničenou zónou úplné beta-hemolýzy. Opouzdřené kmeny pak rostou v koloniích o něco větších, mukoidních. Hemolýzu zvýrazníme nižším pH a nižší tensí kyslíku. Potlačíme ji naopak přítomností redukujících cukrů v médiu. Katalasanegativní beta-hemolytické kolonie se řadí do skupiny A pomocí latexové aglutinace. Latexová aglutinace je test založený na reakci antigenu s protilátkou. V případě positivity sledujeme aglutinaci (shlukování). *Streptococcus pyogenes* má dále pozitivní tzv. PYR test na pyrrolidonylaminopeptidasu. V případě positivity pozorujeme barevnou změnu. (Votava, 2003; Batt et al., 2014; Mahon et al., 2015).

Kultivační test má vysokou senzitivitu i specifitu a zjistíme nejen přítomnost či nepřítomnost *Streptococcus pyogenes*, ale i případných jiných patogenních bakterií a můžeme určit jejich citlivost na antibiotika. Nevýhodou ovšem je, že negativní výsledek máme za 24 hodin a pozitivní za 48 hodin a to pouze za předpokladu, že byl odběr vzorku proveden dopoledne tak, aby měla laboratoř dostatek času na zpracování, zhodnocení a předání výsledku. (Kuchynková, 2015)

#### **1.2.1.1 Krevní agar**

Krevní agar řadíme mezi půdy obohacené krví. Někteří ji však pro nenahraditelnost v klinické mikrobiologii řadí mezi půdy základní. Jiní ji pak pro možnost diagnostiky hemolytických schopností mikrobů zařazují mezi půdy diagnostické. (Votava, 2000)

Pro přípravu krevního agaru se u nás používá většinou ovčí krev. Protože je odebírána hlavně zdravým beranům, běžně ji označujeme jako krev beraní. Na pohlaví zvířete zde ovšem nezáleží. Krevní agar se připravuje přidáním 5 až 10 % (obvykle 7 %) sterilní

defibrilované ovčí krve k agarovému základu ochlazenému na maximálně 43 °C. Krev by měla mít pokojovou teplotu. Půda se po opatrném promíchání vylévá do Petriho misek nebo výjimečně do zkumavek jako šikmý krevní agar. Běžně připravovaný krevní agar je obohacen celou krví, obsahuje tedy nejen erytrocyty, ale i několik procent krevního séra. Díky jeho poměrně vysoké výživové hodnotě na něm vyrostou naprostá většina lékařsky důležitých mikrobů. Jeho výhodou je, že umožňuje pozorovat hemolytické vlastnosti vypěstovaných kmenů bakterií a díky tomu je v některých případech přímo určit. Některé laboratoře, hlavně ve Velké Británii, využívají krevní agar připravený z koňské krve. Hemolytické reakce na krevním agaru připraveném z lidské nebo koňské krve jsou odlišné. Stanovení citlivosti na antibiotika se provádí na agaru připraveném z koňské krve. (Votava, 2000)

### **1.3 Imunoturbidimetrie**

Imunoturbidimetrie patří mezi imunochemické metody, které fungují na principu reakce antigenu s protilátkou a můžeme je tedy využívat k detekci dané protilátky či antigenu. Imunochemické metody využívají různé markery ke zviditelnění proběhlé reakce. V klinické mikrobiologii používáme tyto metody k detekci mikroorganismů v případech, kdy nelze využít kultivace nebo je kultivační doba dlouhá, dále k detekci mikroorganismu ve vzorku či k identifikaci již narostlých a izolovaných mikroorganismů. (Delost, 2015)

Antigenem rozumíme makromolekulární látku přirozeného nebo syntetického původu, kterou dokáže imunitní systém rozeznat a odlišit ji od vlastních struktur. Má schopnost vyvolat imunitní odpověď a také dokáže s vytvořenými buňkami či protilátkami reagovat. Protilátky jsou souborem rozpoznávacích a obranných glykoproteinů. Protilátky neboli imunoglobuliny mají charakteristickou strukturou a vykazují specifickou vazebnou aktivitu k antigenu, na základě jehož podnětu se daná protilátka vytvořila v organismu. Vazbou mezi antigenem a specifickou protilátkou vznikají imunokomplexy, čehož využíváme k důkazu jejich přítomnosti ve vzorku. Pomocí známe protilátky tedy můžeme zjistit, zda se ve vzorku nachází hledaný antigen a nebo naopak, pomocí známého antigenu určit přítomnost či nepřítomnost hledané protilátky. (Matěička et al., 2004)

Turbidimetrie je metoda kvantitativní analýzy využívaná od padesátých let minulého století. Imunoturbidimetrii využíváme k určení množství antigenu nebo protilátky

v roztoku. Jejich interakcí vznikají imunokomplexy, které zapříčiňují vznik zákalu. Následně spektrofotometricky měříme intenzitu světla procházejícího roztokem se vzniklým zákalem. Koncentrace příslušného antigenu je úměrná rychlosti tvorby nebo hustotě zákalu. (McClatchey, 2002; Ferencík et al., 2004)

Turbidimetrické reakce probíhají v tekutém prostředí v měřicí kyvetě, kde je pufr, enhancující látka, která urychluje a stabilizuje reakci (obvykle se jedná o polyetylen glykol, PEG), naředěný antigen a vhodná protilátka. Množství vytvořených komplexů je přímo úměrné koncentraci antigenu při konstantní vysoké koncentraci specifických protilátek. Pracovní koncentrační rozmezí, pro které platí tato závislost, je ohraničené nejvyšší koncentrací kalibrátoru. Vzorky obsahující vyšší koncentraci antigenu je potřeba otestovat znovu ve vhodném naředění. (Bartůňková a Paulík, 2011)

Turbidimetrie využívá obvykle jako zdroj světla diodu a přímo proti zdroji světla je umístěn detektor. V tomto případě měříme úbytek intenzity světla procházejícího roztokem v kyvetě obsahující komplexy antigen-protilátka, které světlo odráží. Turbidimetrie může být uspořádána do dvou systémů. Prvním z nich je „end point“, druhým kinetický („rate“). V systému „end point“ proběhne měření po smíchání antigenu a protilátky v pufru a PEG obvykle za 10-20 minut. Systém se ovšem nemusí vyrovnat se situací, kdy se ve zkoumaném vzorku nachází velké množství měřené látky. Pak může docházet u vysoce koncentrovaných vzorků k naměření falešně nízké hodnoty. Výrobci protilátek se proto snaží nastavit systém tak, aby linearita reakce mezi protilátkou a antigenem byla co největší. Kinetický systém je náročnější na přístrojovou techniku i na protilátky. Kyveta obsahuje míchací systém. Měření začíná v okamžiku, kdy do kyvety obsahující pufr, PEG a antigen přidáme protilátku. Reakce je velmi rychlá. Měří se přírůstek vzniku precipitátu v pravidelných intervalech, obvykle pětivteřinových. Program vyhodnocuje nárůst hodnot. Po dosažení rovnovážného stavu, který nastává během desítek vteřin, je měření ukončeno. Systém dokáže detekovat podle typu nárůstu precipitátu netypické koncentrace měřené látky, což je jeho výhodou. Pomocí pokynů obsluze nebo procesoru tak dokáže reakci na závěr korigovat přidáním naředěného antigenu nebo další dávky protilátky a okamžitě provést tzv. dotitrování nadbytku antigenu, ev. protilátky. (Bartůňková a Paulík, 2011)

Streptokokový antigen lze vyšetřit v ambulantních podmínkách. Vyšetření určí okamžitě přítomnost *Streptococcus pyogenes* a je lacinější než kultivace. Oproti



kultivaci ovšem nedává informaci o možném dalším původci onemocnění ani o citlivosti na antibiotika. Přímý průkaz antigenu A se může provádět komerčními testy, které lze souhrnně nazvat streptest nebo RADT (rapid antigen detection test). Senzitivita jednotlivých testů se liší, ale specifita bývá vysoká. (Kuchynková, 2015)

Imunoturbidimetrie se také využívá ke stanovení protilátek proti streptolizinu O (ASLO). Vyšetření se provádí například při podezření na akutní poststreptokokovou glomerulonefritidu či k vyloučení revmatické horečky. Zvýšené titry ASLO se objevují 1-3 týdny po infekci. Nejvyšších hodnot dosahují 3-5 týdnů po infekci. Normální hodnota ASLO u dospělých je do 200 a u dětí do 150. (Mesko a Marks, 2002; Teplan, 2010)

## **2 Cíl práce, hypotézy**

### **2.1 Cíle práce**

Cílem práce je osvojit si praktické znalosti správné laboratorní praxe při zpracování výtěru z krku a metody imunoturbidimetrie. Porovnat obě metody z hlediska shody a časové náročnosti při stanovení *Streptococcus pyogenes* z výtěru krku a dále stanovit výhody či nevýhody obou uvedených metod. Zjistit, do jaké míry se lze spoléhat na imunoturbidimetrickou metodu a při jakém výsledku je spolehlivější.

### **2.2 Hypotézy**

1. Předpokládám, že výhodou imunoturbidimetrické metody bude rychlost získání výsledku oproti kultivaci, ovšem nezískáme žádné další informace.
2. Předpokládám, že výsledky obou metod nebudou v mnoha případech shodné.
3. Předpokládám větší spolehlivost imunoturbidimetrické metody při pozitivním výsledku testu.

### **3 Metodika**

Data pro svou bakalářskou práci jsem sbírána v období od 1. 1. 2016 do 31. 12. 2016 na Oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a. s.. Imunoturbidimetrická metoda je prováděna v dětské ambulanci v Nemocnici Písek, a. s. a všechny vzorky tedy pocházely od pacientů dětské ambulance. Ke zpracování získaných dat jsem zvolila metodu kvantitativního výzkumu.

#### **3.1 Kultivace**

##### **3.1.1 Princip metody**

Cílem je izolovat původce v čisté kultuře pro získání dalších charakteristik. Kultivaci řadíme mezi metody přímého průkazu původce onemocnění a spočívá v pěstování mikroorganismů za laboratorních podmínek.

##### **3.1.2 Pracovní postup**

Pro přijetí vzorku do laboratoře, v tomto případě výtěru z krku je nutné dodržet podmínky pro převzetí vzorku, které jsou uvedeny v laboratorní příručce. Žádanka musí obsahovat jméno, příjmení a rodné číslo pacienta (případně jiný identifikační kód) a kód pojišťovny. Dalšími povinnými údaji jsou požadované vyšetření, typ vzorku a klinická diagnóza k danému vyšetření v číselné formě. V případě nasazení léčby uvést název antibiotika. Odesílající oddělení se jménem lékaře, datem a časem odběru vzorku. Vzor žádanky je uveden v příloze č. 1. Vzorek musí být označen jménem, příjmením a rodným číslem pacienta a také zde musí být uveden druh vzorku. Prvním krokem v laboratoři je zkontrolování žádanky a vzorku. Údaje na nich se musí shodovat a musí zde být uvedeny všechny povinné údaje. V případě, že tomu tak není, nebo jsou údaje nečitelné, může dojít k odmítnutí vzorku a tedy jeho nezpracování v laboratoři. Po zkontrolování údajů je žádanka označena datem a časem příjmu vzorku a také jménem a podpisem osoby, která toto provedla. Pacientovi je přiděleno unikátní číslo, které je zaznamenáno jak na žádanku tak i vzorek (viz příloha č. 2) a vše se zapíše do laboratorního informačního systému. Pacient po celou dobu zpracování vzorku vystupuje v laboratoři pouze pod tímto číselným kódem.

Vzorek může být následně zpracován. Petriho misku s krevním agarem nejprve označíme číslem uvedeným na vzorku. Odběrový tampón vyjmeme z odběrové soupravy a začneme vzorek nanášet zhruba na třetinu krevního agarů. Odběrový tampón

přítom otáčíme z různých stran tak, aby byl na kultivační půdu přenesen co nejrepresentativnější vzorek (viz příloha č. 3). Řádně vypálenou mikrobiologickou kličkou (viz příloha č. 4) rozočkujeme vzorek tak, abychom docílili nárůstu jednotlivých kolonií přítomných bakterií (viz příloha č. 5). Proto kličku otáčíme a v průběhu vyměníme za jinou vypálenou kličku. Po nanesení vzorku vytvoříme stafylokokovou čáru a asi na velikost antibiotického disku od stafylokokové čáry umístíme bacitracinový disk (viz příloha č. 6). Zpracovaný výtěr z krku připravený pro inkubaci můžeme vidět v příloze č. 7. Takto naočkované krevní agary inkubujeme v termostatu při 37°C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> (viz příloha č. 8). Odečet provádíme za 24 hodin. *Streptococcus pyogenes* tvoří na krevním agaru drobné kolonie, většinou lesklé, kolem 0,5 mm v průměru (viz přílohy č. 9-12). Kolonie bývají obklopeny dobře ohraničenou zónou úplné beta-hemolýzy (viz příloha č. 13).

Při podezření na přítomnost *Streptococcus pyogenes* na kultivační půdě provádíme další testy. *S. pyogenes* má pozitivní PYR test a řadí se do skupiny A pomocí latexové aglutinace.

### **3.1.2.1 PYR test (PYRAtest)**

#### **3.1.2.1.1 Princip testu**

PYR test je určen pro detekci aktivity pyrrolidonylarylamidázy. Bakteriální pyrrolidonylarylamidáza hydrolyzuje β-naftylamid kyseliny pyroglutamové, obsažené v zóně detekčního proužku. Hydrolyza je detekována reakcí s p-dimethylaminocinamaldehydem, obsaženým v roztoku činidla pro PYR test, za vzniku červeného zbarvení. Test je kromě *Streptococcus pyogenes* pozitivní také pro rod *Enterococcus*. (aktuální příbalová informace k soupravě PYRAtest, 2014)

#### **3.1.2.1.2 Potřeby pro provedení PYR testu**

- Detekční proužek
- Činidlo pro PYR test
- Časovač
- Kolonii bakterií pro testování
- Běžné laboratorní vybavení (očkovací kličky, kahan)

Potřeby pro provedení testu jsou vyobrazeny v příloze č. 14.

### 3.1.2.1.3 Pracovní postup

Pro test používáme 24hodinovou kulturu z vhodného kultivačního média, tedy z krevního agaru. Zónu detekčního proužku nejprve navlhčíme asi 20 µl destilované vody. Očkovací kličkou vetřeme několik kolonií testované kultury do zóny proužku. V případě čisté kultury můžeme testovanou kolonii setřít přímo zónou testovacího proužku z povrchu agaru. Proužek umístíme na vhodnou podložku a necháme inkubovat při laboratorní teplotě 10 minut. Následně přikápneme 1 kapku roztoku činidla pro test PYR na zónu proužku. Po uplynutí 1-2 minut zhodnotíme barevnou reakci na zóně testovacího proužku. Hodnocení PYR testu je uvedeno v tabulce č. 2. Pozitivní reakce je vyobrazena v příloze č. 15.

**Tabulka č. 2: Hodnocení testu PYR**

Výsledek testu:	Barevné vyjádření reakce:
Pozitivní	Červená, červenooranžová, oranžová
Negativní	žlutá

(aktuální příbalová informace k soupravě PYRAtest, 2014)

### 3.1.2.2 Latexová aglutinace (*Protex™ Streptococcal Grouping Latex Kit*)

#### 3.1.2.2.1 Princip testu

Test je využíván k rozlišení beta-hemolytických streptokoků dle Lancefieldové do skupin A, B, C, D, F a G. Principem metody je chemická extrakce skupinově specifických antigenů, které následně reagují se skupinově specifickými králičími protilátkami navázanými na latexových částicích. Tyto latexové částice aglutinují v přítomnosti specifického antigenu. (aktuální příbalová informace k soupravě Protex™ Streptococcal Grouping Latex Kit, 2015)

#### 3.1.2.2.2 Potřeby pro provedení latexové aglutinace

- Soupravu pro provedení latexové aglutinace, která obsahuje:
  - o Latexové reagentie s králičími protilátkami skupiny A, B, C, D, F a G dle Lancefieldové
  - o Pozitivní kontroly
  - o Extrakční reagentii 1
  - o Extrakční reagentii 2
  - o Extrakční reagentii 3

- Testovací karty
- Míchátka
- Jednorázovou mikrobiologickou kličku
- Pipetu
- Zkumavku
- Časovač
- Kolonii bakterií pro testování

Potřebné pomůcky jsou zobrazeny v příloze č. 16.

### **3.1.2.2.3 Pracovní postup**

Všechny reagensie nejprve vytemperujeme na pokojovou teplotu. Latexové reagensie jemně promícháme. Připravíme si zkumavku, do které přidáme 1 kapku extrakčního činidla 1. Vybereme 1-4 beta-hemolytické kolonie, které pomocí jednorázové mikrobiologické kličky přeneseme do zkumavky a rozmícháme v extrakčním činidle 1. Přidáme 1 kapku extrakčního činidla 2. Promícháme jemným proklepáním zkumavky po dobu 5-10 sekund. Přidáme 5 kapek extrakčního činidla a opět jemně promícháme. Do separovaných políček testovací karty kápneme vždy jednu kapku jednotlivých latexových reagensií a kontroly (viz příloha č. 17). Pomocí pipety přidáme do každého políčka testovací karty kapku roztoku připraveného ve zkumavce (viz příloha č. 18). Pomocí míchátek ze soupravy promícháme obsah jednotlivých reakčních políček. Pro každé políčko používáme vždy nové míchátko. Obsah reagenčních políček jemně promícháváme kývavými pohyby destičky. K pozitivní reakci došlo v tom políčku testovací karty, kde pozorujeme aglutinaci. V příloze č. 19 pozorujeme pozitivní reakci s latexovou reagensií skupiny A. U negativního výsledku nepozorujeme aglutinaci. Pozitivní kontroly provádíme tak, že místo vzorku použijeme pozitivní kontroly, které jsou součástí soupravy Protex™ Streptococcal Grouping Latex Kit. (viz příloha č. 20) Mikroorganismy řadící se do skupin A-G dle Lancefieldové jsou uvedeny v tabulce č. 3.

**Tabulka č. 3: Mikroorganismy řadící se do skupin A-G dle Lancefieldové**

<b>Mikroorganismus:</b>	<b>Skupina dle Lancefieldové</b>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	skupina A
<i>Streptococcus agalactiae</i>	skupina B
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i>	skupina C
<i>Enterococcus faecalis</i>	skupina D
<i>Streptococcus sp. typ 2</i>	skupina F
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i>	skupina G

(aktuální příbalová informace k soupravě Protex<sup>TM</sup> Streptococcal Grouping Latex Kit, 2015)

### **3.1.2.3 Stanovení citlivosti na antibiotika (disková difúzní metoda)**

#### **3.1.2.3.1 Princip testu**

Principem testu je pěstování mikroorganismu za přítomnosti antibiotik a následné sledování, zda daná bakterie roste za jejich přítomnosti či nikoliv.

#### **3.1.2.3.2 Potřeby pro provedení testu**

- Testovaná kolonie bakterií
- Zkumavka
- Fyziologický roztok
- Denzitometr
- Mueller-Hinton agar s koňskou krví
- Pasteurova pipeta
- Posuvné měřítko

#### **3.1.2.3.3 Pracovní postup**

Do zkumavky s fyziologickým roztokem přeneseme kolonie bakteriálních buněk, u kterých testujeme citlivost na antibiotika tak, aby vznikl zákal 0,5 McFarlanda. Tuto skutečnost si ověříme pomocí denzitometru (viz příloha č. 21) a podle potřeby případně přidáváme další bakteriální kolonie či fyziologický roztok. Po dosažení potřebného zákalu rozočkujeme roztok na kultivační půdu pro testování citlivosti na antibiotika ve dvou na sebe kolmých směrech. V případě *Streptococcus pyogenes* využíváme Mueller-Hinton agar s koňskou krví, protože na Mueller-Hinton agaru roste velmi špatně (viz příloha č. 22). Na takto připravený Mueller-Hinton agar s koňskou krví

umístíme antibiotické disky penicilinu, erythromycinu, clindamycinu, pokud lékař neurčí jinak. Erythromycin a clindamycin od sebe umístíme ve vzdálenosti 12- 16 mm (viz příloha č. 23). Takto připravený Mueller Hinton agar s koňskou krví umístíme do termostatu s 5 % tensí CO<sub>2</sub> na 16- 20 hodin. Po uplynutí této doby odečítáme velikost vytvořených inhibičních zón (IZ) kolem jednotlivých antibiotických disků pomocí posuvného měřítka (viz příloha č. 24). Minimální inhibiční zóny znamenající účinnost antibiotika jsou uvedeny v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4: Minimální IZ, kdy je antibiotikum účinné**

Antibiotikum:	Minimální IZ (mm):
Penicilin	18
clindamycin	17
erythromycin	21

(Tabulky EUCAST, 2017)

## **3.2 Imunoturbidimetrie (QuikRead go Strep A)**

### **3.2.1 Princip testu**

Souprava QuikRead go Strep A je kvalitativní test určený k detekci přítomnosti pyogenního streptokoka (StrepA) ve vzorcích z výtěru krku. Test se provádí pomocí přístroje QuikRead go. QuikRead go Strep A je imunoturbidimetrický test založený na mikročasticích pokrytých králičím antisérem proti Strep A. Pyogenní streptokok přítomný ve vzorku reaguje s mikročasticemi. Výsledná změna turbidity roztoku je měřena pomocí přístroje QuikRead go. (aktuální příbalová informace k metodě QuikRead go Strep A)

### **3.2.2 Potřeby pro provedení testu**

- Souprava pro test, která obsahuje:
  - Víčka s reagencií Strep A
  - Pufr v předplněných kyvetách
  - Extrakční reagencie 1
  - Extrakční reagencie 2
  - Extrakční zkumavky
  - Pozitivní kontrola
  - Negativní kontrola
  - Tampóny QuikRead go Strep A



### **3.2.3 Pracovní postup**

Předplněné kyvety před použitím vytempetujeme na pokojovou teplotu. Kyvety se nedotýkáme v místě průhledného rovného povrchu na její spodní části (optická část). Opatrně odstraníme z kyvety fólii tak, aby se její obsah nevytlil. Sterilní tampón QuikRead go Strep A vyjmeme z ochranného obalu a pacientovi odebereme vzorek. Vzorek odebíráme z tonzil na obou stranách hrdla a/nebo ze zadní části nosohltanu a tampónem přitom otáčíme. Při odběru se nedotýkáme jiných částí dutiny ústní. Tampón umístíme do extrakční zkumavky. Do zkumavky přidáme 2 kapky bezbarvé extrakční reagensie 1 a poté 2 kapky extrakční reagensie 2. Vzorek v tuto chvíli změní barvu na žlutooranžovou. Tampónem v roztoku mícháme 30 sekund a poté jej necháme v roztoku po dobu alespoň 90 sekund, ne však déle než 15 minut. Během extrakce bakterie ve vzorku lyzují a testovaný antigen se uvolní do tampónu. Tampón vyjmeme z extrakční zkumavky a vložíme jej do předplněné kyvety. Přeneseme přitom co nejvíce tekutiny a promícháme. Zamícháním tampónu v roztoku se antigen uvolní do roztoku. Roztok změní barvu na červenou. Barevná změna značí neutralizaci extrakčního roztoku a přenos vzorku do roztoku. Vyjmeme tampón, a aby se z něj uvolnil potřebný roztok pro měření, jemně ho zatlačíme proti vnitřní stěně kyvety. Zbývající roztok z extrakční zkumavky nalijeme do kyvety. Pomocí víčka s reagensií Strep A pevně uzavřeme kyvetu. Vnitřní růžovou část víčka nezatlačujeme dolů. Na obrazovce přístroje QuikRead go zvolíme měření. Kyvetu vložíme do přístroje čárovým kódem směrem k sobě. Přístroj nejdříve změří blank vzorku a poté koncentraci pyogenního streptokoka ve vzorku. Po dokončení měření, které trvá 1-3 minuty, se na obrazovce objeví výsledek a kyveta se automaticky vysune z měřící komůrky. Celý postup spolu s obrázkem je také znázorněn v příloze č. 25. Pozitivní výsledek testu a přístroj QuikRead go je zobrazen v příloze č. 26. Interpretace výsledku testu je vidět v tabulce č. 5.

**Tabulka č. 5: Interpretace výsledku testu QuikRead go Strep A**

Výsledek testu Strep A:	Interpretace výsledku testu:
Strep A pozitivní	Koncentrace Strep A ve vzorku odpovídá koncentraci bakterií v hodnotě alespoň $7 \cdot 10^4$ CFU(Colony Forming Units)/tampón.
Strep A negativní	Vzorek neobsahuje měřitelnou koncentraci Strep A antigenu.

(aktuální příbalová informace k metodě QuikRead go Strep A)

## 4 Výsledky

V dětské ambulanci v Nemocnici Písek, a. s. bylo v roce 2016 provedeno celkem 218 vyšetření metodou QuikRead go Strep A. Z toho celkem 143 vyšetření bylo přezkoumáno kultivačně na Oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a. s.. V tabulce č. 6 je uveden celkový přehled negativních a pozitivních výsledků imunoturbidimetrické metody.

**Tabulka č. 6: Celkový přehled pozitivních a negativních výsledků metody QuikRead go Strep A**

Celkem provedeno testů:	218
Celkový počet pozitivních výsledků:	102
Celkový počet negativních výsledků:	116

(vlastní výzkum)

Z celkového počtu 218 vzorků, bylo 102 (46,8 %) z nich metodou QuikRead go Strep A určeno jako pozitivní a 116 (53,2 %) jako negativní. Celkový přehled výsledků přezkoumaných kultivačně je uveden v tabulce č. 7.

**Tabulka č. 7: Celkový přehled výsledků přezkoumaných kultivačně**

Výsledek imunoturbidimetrické metody:	Celkem vyšetření s tímto výsledkem:	Počet přezkoumaných výsledků kultivačně:
pozitivní	102	67
negativní	116	76

(vlastní výzkum)

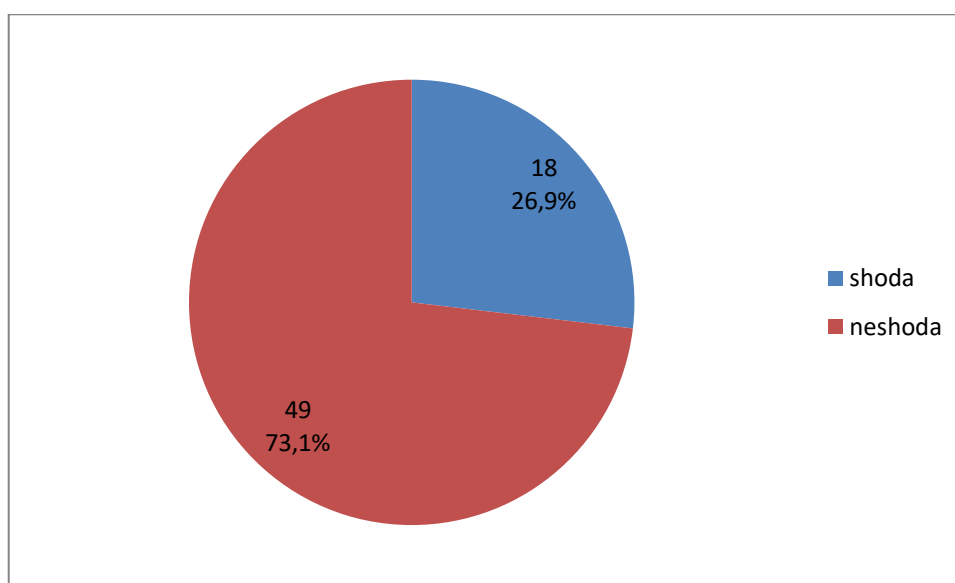
Z celkového počtu 102 výsledků, které byly imunoturbidimetrickou metodou určeny jako pozitivní, jich bylo 67 přezkoumáno kultivační metodou. Vzorků přezkoumaných po negativním výsledku bylo 76 z celkového počtu 116. Uvedeme-li tyto hodnoty v procentech, bylo vzorků vyšetřených kultivačně po negativním a pozitivním výsledku testu QuikRead go Strep A téměř totožné množství. Konkrétně 65,7 % vzorků s pozitivním výsledkem a 65,5 % vzorků s negativním výsledkem. Tabulka č. 8 je zaměřena na pozitivní výsledky imunoturbidimetrického testu a jejich shodu s následně provedenou kultivací.

**Tabulka č. 8: Shoda imunoturbidimetrické a kultivační metody v případě pozitivního výsledku metody QuikRead go Strep A**

Celkem vzorků:	67
Shoda:	18
Neshoda:	49

(vlastní zdroj)

67 vzorků, které imunoturbidimetrická metoda vyhodnotila jako pozitivní, byly přezkoumány kultivací. U 18 z těchto vzorků byla prokázána přítomnost *Streptococcus pyogenes* ve výtěru z krku a výsledek obou metod byl tedy shodný. Ovšem u zbylých vzorků, tedy 49, nebyla přítomnost *Streptococcus pyogenes* prokázána a výsledek tedy shodný nebyl. Procentuální shoda obou metod v případě pozitivního výsledku imunoturbidimetrické metody je znázorněna v obrázku č. 1.

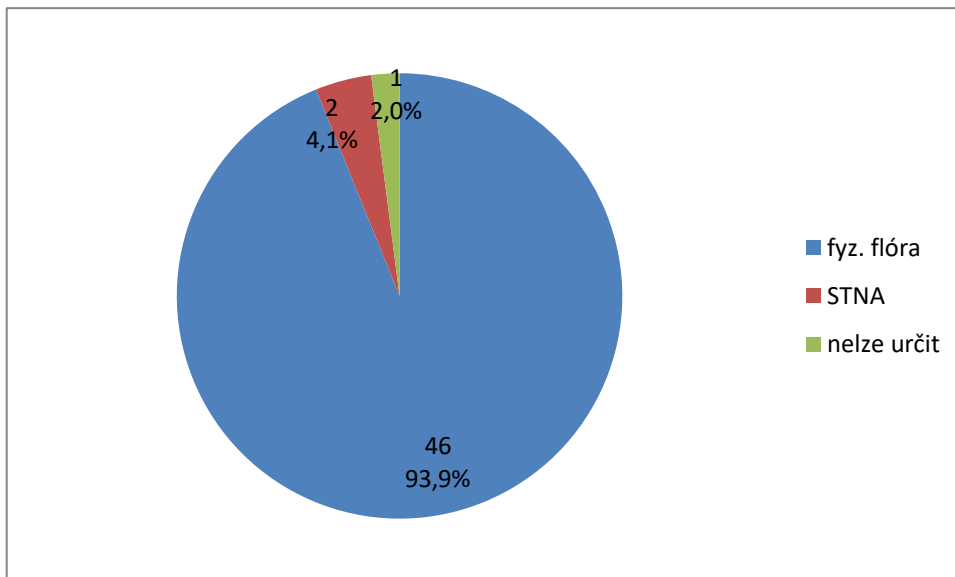


(vlastní zdroj)

**Obrázek č. 1: Procentuální shoda obou metod v případě pozitivního výsledku imunoturbidimetrické metody**

Jak je znázorněno na obrázku č. 1, obě metody, kultivace a imunoturbidimetrie, byly shodné pouze v 26,9 % případů. Neshoda pak byla pozorována u 73,1 % vyšetřovaných vzorků. Dle statistického testování pomocí chí kvadrát testu s 5 % hladinou významnosti bylo určeno, že rozdíl mezi očekávanými a pozorovanými hodnotami, tedy rozdíl mezi výsledky získanými imunoturbidimetricky a kultivačně, je statisticky

významný. Kultivací zjištěné výsledky u vzorků, které nebyly ve shodě s imunoturbidimetrickou metodou, jsou znázorněny na obrázku č. 2.



(vlastní zdroj)

**Obrázek č. 2: Výsledky kultivačního vyšetření v případě neshody s imunoturbidimetrickou metodou po jejím pozitivním výsledku**

Celkem 49 vzorků nevykazovalo stejný výsledek po kultivačním vyšetření a vyšetření metodou QuikRead go Strep A. U 46 vzorků byla kultivací zjištěna fyziologická flóra (93,9 %). Dva ze vzorků (4,1 %) vykazovaly přítomnost streptokoků jiné skupiny než A podle Lancefieldové a u jednoho ze vzorků (2 %) nebylo možné dourčení. Následující tabulka (tabulka č. 9) ukazuje shodu imunoturbidimetrické metody s kultivací v případě negativního výsledku imunoturbidimetrické metody.

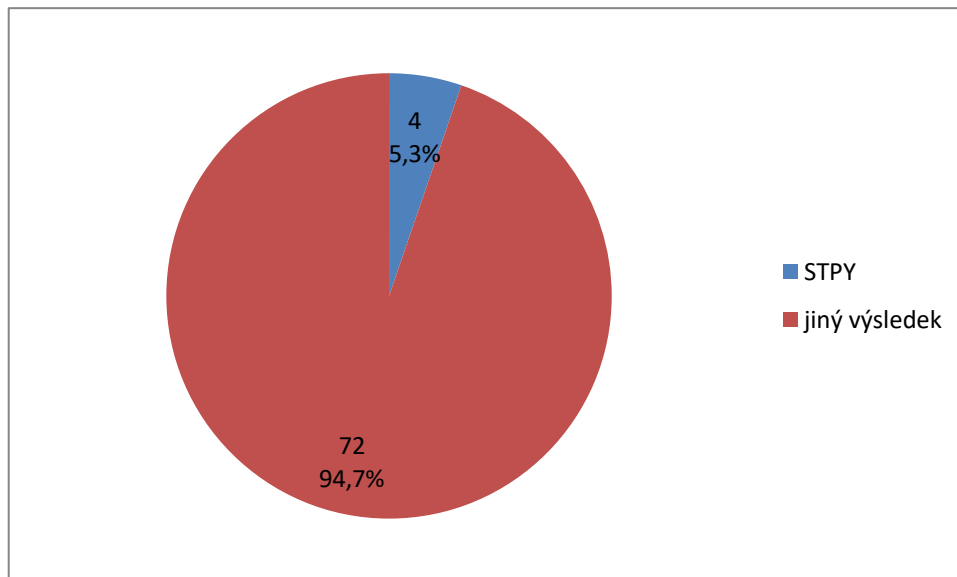
**Tabulka č. 9: Shoda kultivace a metody QuikRead go Strep A v případě negativního výsledku imunoturbidimetrie**

Celkem vzorků:	76
Shoda:	72
Neshoda:	4

(vlastní zdroj)

Vzorků, které metoda QuikRead go Strep A určila jako negativní, bylo celkem 76. Z těchto vzorků došlo ke shodě, tedy nepřítomnosti *Streptococcus pyogenes* u 72. V ostatních případech byla přítomnost *Streptococcus pyogenes* prokázána. Procentuální

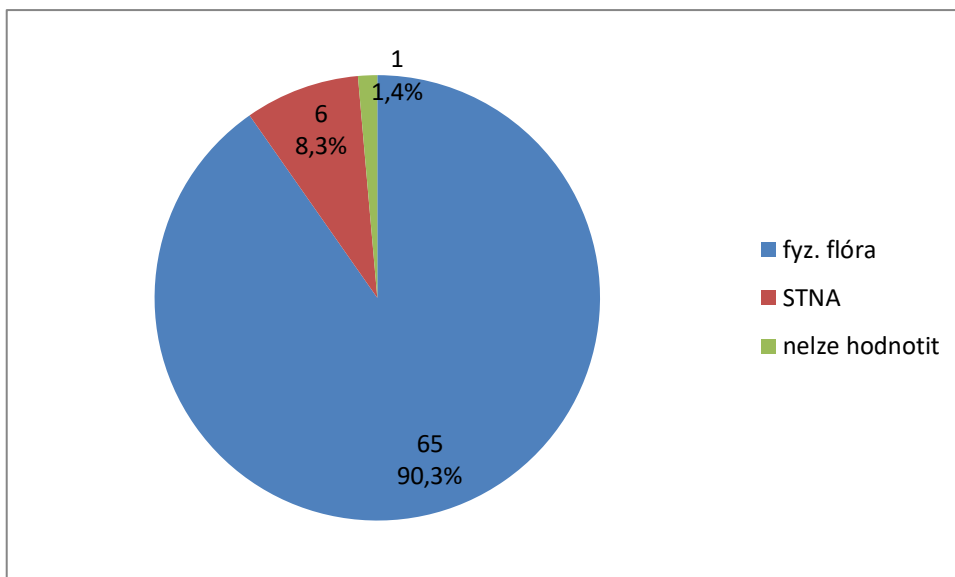
úspěšnost imunoturbidimetrické metody v případě jejího negativního výsledku je znázorněna na obrázku č. 3.



(vlastní zdroj)

**Obrázek č. 3: Shoda kultivace a imunoturbidimetrické metody v případě jejího negativního výsledku**

Obě z metod neprokázali přítomnost *Streptococcus pyogenes* v 94,7 % případů. U 5,3 % vzorků byl výsledek metody QuikRead go Strep A negativní, zatímco kultivace prokázala opak. Dle statistického testování pomocí chí kvadrát testu s 5 % hladinou významnosti bylo prokázáno, že rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými výsledky, tedy mezi výsledky kultivačního a imunoturbidimetrického vyšetření, je statisticky významný. Tento výsledek je však potřeba brát s určitou rezervou, protože nebyla splněna podmínka dobré aproximace. První očekávaná četnost měla hodnotu 4, tedy nižší než 5. Protože měla data pouze dvě kategorie, což je minimum pro provedení chí kvadrát testu, není možné to napravit slučováním kategorií. Jedná se sice o pouze těsné porušení předpokladu, ale hodnota testovaného kritéria byla vyšší než kritická hodnota také jen těsně. Výsledek tohoto testu tedy může být určitým způsobem zkreslený. Obrázek č. 4 ukazuje zastoupení výsledků kultivace, kdy nebyla prokázána přítomnost *Streptococcus pyogenes*.



(vlastní zdroj)

**Obrázek č. 4: Výsledky kultivačního vyšetření v případě neshody s imunoturbidimetrickou metodou po jejím negativním výsledku**

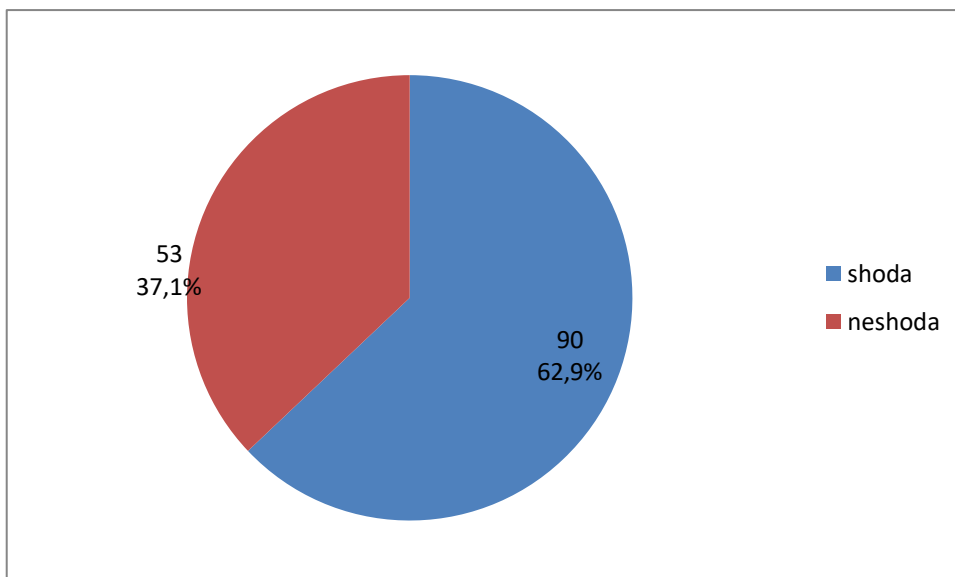
Vzorků, ve kterých nebyla zjištěna přítomnost *Streptococcus pyogenes* ani jednou z metod, bylo celkem 72. Z nich v 65 případech (90,3 %) byla kultivačně zjištěna přítomnost fyziologické flóry, v 6 vzorcích (8,3 %) byly přítomny streptokoky jiné skupiny než A dle Lancefieldové a v jednom případě (1,4 %) nebylo možné výsledek vyhodnotit. V tabulce č. 10 je uvedena celková shoda sledovaných metod.

**Tabulka č. 10: Celková shoda kultivace a metody QuikRead go Strep A**

Celkem vzorků:	143
Shoda:	90
Neshoda:	53

(vlastní zdroj)

Z tabulky č. 10 je zřejmé, že celkem bylo oběma ze sledovaných metod vyšetřeno 143 vzorků. Z toho 90 výsledků bylo shodných a 53 rozdílných. Na obrázku č. 5 je znázorněna celková procentuální shoda ve výsledcích metody kultivační a imunoturbidimetrické.

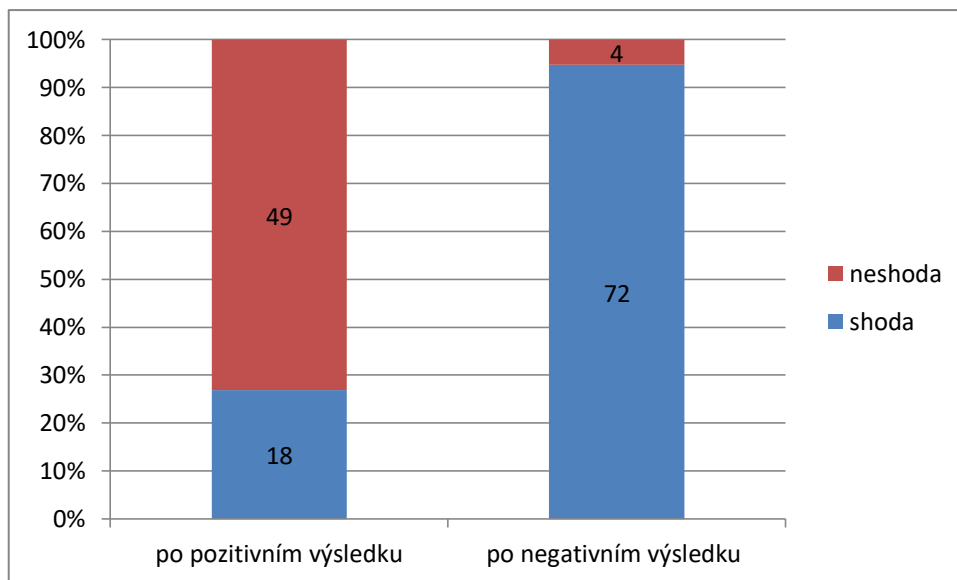


(vlastní zdroj)

**Obrázek č. 5: Celková shoda kultivace a metody QuikRead go Strep A**

Na obrázku č. 5 je znázorněna procentuální celková shoda kultivace a metody QuikRead go Strep A. Ke shodnému výsledku došlo u 62,9 % vzorků. Neshodné výsledky byly pozorovány u 37,1 % vzorků. Na obrázku č. 6 je porovnána úspěšnost imunoturbidimetrické metody v případě pozitivního výsledku oproti úspěšnosti v případě výsledku negativního.





(vlastní zdroj)

**Obrázek č. 6: Porovnání shody metody QuikRead go Strep A s kultivací v případě pozitivního a negativního výsledku metody QuikRead go Strep A**

Zatímco spolehlivost pozitivního výsledku metody QuikRead go Strep A byla 26,9 %, v případě výsledku negativního byla úspěšnost výrazně vyšší (94,7 %).

## 5 Diskuse

U infekcí způsobených bakterií *Streptococcus pyogenes* je velmi důležitá včasná diagnostika, zvláště kvůli tzv. pozdním následkům streptokokových nákaz, mezi něž řadíme akutní glomerulonefritidu a revmatickou horečku. Těmto onemocněním lze předcházet včasným zahájením antibiotické terapie.

V Nemocnici Písek, a. s. je přítomnost *Streptococcus pyogenes* ve výtěru z krku zjišťována pomocí kultivace na Oddělení klinické mikrobiologie. Další možností je imunoturbidimetrické vyšetření prováděné v dětské ambulanci v Nemocnici Písek, a. s..

Kultivační vyšetření je velice spolehlivé za předpokladu, že odběr vzorku byl proveden správně, stejně jako další části preanalytické fáze. Toto již v laboratoři nelze ovlivnit, ovšem je kladen důraz na další postup, aby nedocházelo k chybám vzniklým v laboratoři. V případě imunoturbidimetrického vyšetření je dodržován přesný pracovní postup k této metodě. K dispozici jsou kontrolní vzorky, pomocí kterých můžeme ověřovat správnou funkci metody. V případě rozhodnutí lékaře je výsledek imunoturbidimetrické metody ověřen kultivačně. V roce 2016 bylo v dětské ambulanci vyšetřeno celkem 218 pacientů podezřelých z nákazy bakterií *Streptococcus pyogenes*. Z tohoto počtu bylo 143 vzorků přezkoumáno kultivačně.

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na vzorky, které byly vyhodnoceny oběma ze sledovaných metod. V příbalové informaci k QuikRead go Strep A je uváděna shoda mezi sledovanými metodami 93 %. Případný jiný výsledek, by se tedy mohl objevit přibližně u 7 % vzorků. Je zde také uvedeno, že čím menší množství *Streptococcus pyogenes* se ve vzorku nachází, tím menší je spolehlivost metody. Nízké koncentrace bakterie ve vzorku tedy mohou vést k chybně negativnímu výsledku. V případě pozitivního výsledku je udávána o trochu větší spolehlivost než u výsledku negativního (příbalová informace k metodě QuikRead go Strep A). Dle mého pozorování byla ovšem zjištěna shoda mezi metodami výrazně nižší. Konkrétně ze 143 vzorků byl shodný výsledek u 90 z nich (62,9 %). Pokud bychom se zaměřili zvláště na shodu metod po pozitivním výsledku imunoturbidimetrické metody, bylo stejného výsledku dosaženo pouze u 26,9 % vzorků. Dle statistického testování pomocí chí kvadrát testu s 5 % hladinou významnosti bylo určeno, že rozdíl mezi očekávanými a pozorovanými hodnotami, tedy rozdíl mezi výsledky získanými imunoturbidimetricky a kultivačně, je statisticky významný. Po negativním výsledku metody QuikRead go

Strep A byla shoda s kultivací pozorována v 94,7 % případech. Dle statistického testování pomocí chí kvadrát testu s 5 % hladinou významnosti bylo prokázáno, že rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými výsledky po negativním výsledku metody QuikRead go Strep, tedy mezi výsledky kultivačního a imunoturbidimetrického vyšetření, je statisticky významný. Tento výsledek je však potřeba brát s určitou rezervou, protože nebyla splněna podmínka dobrá aproximace. První očekávaná četnost měla hodnotu 4, tedy nižší než 5. Protože měla data pouze dvě kategorie, což je minimum pro provedení chí kvadrát testu, není možné to napravit slučováním kategorií. Jedná se sice o pouze těsné porušení předpokladu, ale hodnota testovaného kritéria byla vyšší než kritická hodnota také jen těsně. Výsledek tohoto testu tedy může být určitým způsobem zkreslený. Pokud tyto výsledky porovnáme s informacemi uváděnými v příbalové informaci k metodě QuikRead go Strep A, byla pozorována výrazně nižší shoda výsledků obou metod po pozitivním výsledku imunoturbidimetrické metody a naopak v případě negativního výsledku metody byla shoda trochu vyšší. Celkově však byla metoda QuikRead go Strep A o 30,1 % méně spolehlivá, než udává příbalová informace. Tato chybovost zřejmě nebyla způsobena odchylkou od daného postupu při samotném provedení metody, ale spíše bych ji přičítala nesprávné preanalytické fázi, kdy může být velice obtížné provést výtěr z krku tak, aby nedošlo k znehodnocení vzorku, zvláště v případě, kdy je odebírán nespolupracujícím dětskému pacientovi. Jak je uvedeno v příbalové informaci k metodě QuikRead go Strep A, může docházet k chybně pozitivnímu výsledku za předpokladu, že se odběrový tampón dotkne tváří, dásní nebo jazyka.

Zaměřila jsem se také na rozdíly mezi metodami týkající se rychlosti získání výsledku a dalších informací, které je možno následně získat. Za výhody imunoturbidimetrické metody považuji rychlost získání výsledku, který je k dispozici přibližně za 5-10 minut od odebrání vzorku. Test je možné provádět v ambulantních podmínkách a je lacinější. Na rozdíl od kultivace ovšem nezachytí případného jiného původce onemocnění než je *Streptococcus pyogenes*. Také není možné provádět následné určení citlivosti na antibiotika. U kultivačního vyšetření je výsledek možné získat nejdříve za 24 hodin, ovšem dokážeme zjistit i přítomnost jiných původců onemocnění a je možné stanovit citlivost na antibiotika. Toto vyšetření je oproti předchozímu finančně náročnější a je možné ho provádět pouze v laboratořích na to vybavených. Stejně výhody a nevýhody sledovaných metod uvádí také Kuchynková (2015).

Z výše uvedeného tedy můžu říci, že hypotéza č. 1 (Předpokládám, že výhodou imunoturbidimetrické metody bude rychlost získání výsledku oproti kultivaci, ovšem nezískáme žádné další informace.) je správná. Jako správnou mohu označit také hypotézu č. 2 (Předpokládám, že výsledky obou metod nebudou v mnoha případech shodné.). Hypotéza č. 3 (Předpokládám větší spolehlivost imunoturbidimetrické metody při pozitivním výsledku testu.) ovšem mému pozorování neodpovídá.

## 6 Závěr

Závěrem bych chtěla říci, že jsem si jak metodu QuikRead go Strep A, prováděnou v dětské ambulanci v Nemocnici Písek, a. s., tak kultivační stanovení *Streptococcus pyogenes*, prováděné na Oddělení klinické mikrobiologie v Nemocnici Písek, a. s., z výtěru krku řádně vyzkoušela. V laboratoři jsem si prošla celým procesem od přijetí vzorku až po vydání výsledku. Zaměřila jsem se na porovnání obou metod, zejména na jejich shodu ve výsledcích vyšetřovaných vzorků odebraných totožným pacientům ve stejný čas. Mezi výhody metody QuikRead go Strep A bych zařadila zejména rychlost získání výsledku a možnost provedení vyšetření přímo v ambulanci. Nedostatkem ovšem je, že nezjistíme přítomnost případného jiného původce onemocnění a nelze provádět určení citlivosti na antibiotika, což je možné v případě kultivačního vyšetření. Jako nedostatek kultivace vidím delší časový rozestup od přijmutí vzorku laboratoři do vydání výsledku. Ovšem za předpokladu, že je správně provedena preanalytická, analytická i postanalytická fáze zpracování vzorku se spolehlivost kultivace blíží 100 %, udávaná spolehlivost metody QuikRead go Strep A je nižší (93 %), což pokládám za nespornou výhodu kultivace.

Metodou QuikRead go Strep A bylo v roce 2016 vyšetřeno celkem 218 vzorků, z nich 143 bylo vyšetřeno také kultivačně. Z celkového počtu 143 vzorků vykazovalo stejný výsledek, tedy buď pozitivní či negativní na přítomnost *Streptococcus pyogenes*, 90 z nich (62,9 %). Pokud bychom se zaměřili na shodu imunoturbidimetrické metody s kultivací po pozitivním výsledku imunoturbidimetrické metody, vykazovalo z celkového počtu 67 vzorků přítomnost *Streptococcus pyogenes* v kultivačním vyšetření pouze 18 z nich (26,9 %). V případě negativního výsledku metody QuikRead go Strep A bylo dosaženo shodného výsledku kultivačně v 94,7 % případů. Ze 76 vzorků bylo kultivací určeno jako negativní 72. Můžeme tedy říci, že výrazně větší shody sledovaných metod bylo dosaženo u vzorků, které byly imunoturbidimetricky určeny jako negativní.

Shoda kultivace a metody QuikRead go Strep A se v tomto případě velmi liší od shody udávané v dostupných zdrojích. V tomto případě byla problémem spolehlivost výsledků získaných imunoturbidimetricky, které označovaly vzorek jako pozitivní. Proto pokládám za důležité kontrolování výsledků získaných metodou QuikRead go Strep A také kultivačně. Jiného výsledku by bylo možná dosaženo, pokud bychom testovali

vzorky získané od dospělých pacientů, kteří při odběru vzorku lépe spolupracují. V případě imunoturbidimetrické metody je totiž velmi důležité, aby se odběrový tampón nedotknul tváří, dásní či jazyka, což může být obtížné u nespolupracujícího dětského pacienta. V návodu k metodě QuikRead go Strep A je na důležitost této skutečnosti upozorňováno. V případě nedodržení tohoto pokynu může být vzorek určen jako falešně pozitivní, což může být příčinou takto výrazné odlišnosti mezi deklarovanou spolehlivostí metody QuikRead go Strep A a získaným výsledkům.

## 7 Seznam literatury

1. *Aktuální příbalová informace k metodě QuikRead go Strep A*. [online]. [cit. 2016-11-10]. Dostupné z: <http://www.oriondiagnostica.cz/Produkty/QuikRead-go/QuikRead-go-Strep-A/>
2. *Aktuální příbalová informace k soupravě Protex<sup>TM</sup> Streptococcal Grouping Latex Kit*, 2015. Pro-lab diagnostics.
3. *Aktuální příbalová informace k soupravě PYRAtest*, 2014. [online]. Erba Lachema s.r.o. [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: [www.erbalachema.com](http://www.erbalachema.com)
4. BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, s. 39-56. ISBN 978-80-247-3533-7.
5. BATT, Carl A., TORTORELLO, Mary L. (eds.), 2014. *Encyclopedia of food microbiology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, s. 351-367. ISBN 978-0-12-384730-0.
6. BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, H., SOUČEK, A., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, s. 193-215
7. BOLOGNIA, Jean, JORIZZO, Joseph L., SCHAFFER, Julie V. (eds.), 2012. *Dermatology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, s. 1187-1220. ISBN 978-0-7234-3571-6.
8. DELOST, Maria Dannessa., 2015. *Introduction to diagnostic microbiology for the laboratory sciences*. Jones & Bartlett Learning, s. 59-83. ISBN 1284032310.
9. FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., MAŤHA, V., 2004. *Ilustrovaný imunologický slovník*. Praha: Galén, 288 s. ISBN 80-7262-243-9.
10. FRANKEL, David H., 2006. *Field guide to clinical dermatology*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, Field guide (Philadelphia, Pa.), s. 70-73. ISBN 9780781756273.
11. GÖPFERTO VÁ, D., 2002. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. 3. dopl. vyd. Praha: Triton, s. 90-120. ISBN 80-7254-223-0.
12. HORANOVÁ, V., 2013. *Úvod do základů hygieny, epidemiologie, mikrobiologie a imunologie v bodech*. České Budějovice: Vlastimil Johanus. 111 s. ISBN 978-80-87510-27-8.

13. KLABAN, V., 1999 *Svět mikrobů: malý mikrobiologický slovník*. Hradec Králové: Gaudeamus, 303 s. ISBN 80-7041-639-4.
14. KLABAN, V., 2005. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, 508 s. ISBN 80-7262-341-9.
15. KŘÍŽOVÁ, P., PETRÁŠ, P., 2012. *Syndrom toxického šoku*. [online]. Státní zdravotní ústav. [cit. 2016-12-11]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/syndrom-toxickeho-soku>
16. KUCHYNKOVÁ, Z., BÉBROVÁ, E., KUČEROVÁ, D., 2012. *Faryngitida způsobená Streptococcus pyogenes*. [online]. Otorinolaringologie a foniatrie. 61(1), 60-66. [cit. 2016-12-10]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/otorinolaryngologie-foniatrie-clanek/faryngitida-zpusobena-streptococcus-pyogenes-37613>
17. KUCHYNKOVÁ, Z., 2015. *Dětská otolaryngologie: nejčastější situace v ambulantní praxi*. Praha: Grada Publishing. s. 27-45. ISBN 978-80-247-4177-2.
18. KUO, C., THAO, N., HSIEH, I., LIN, Y., WU, J., HUNG, Y., 2017. *Immunization with a streptococcal multiple-epitope recombinant protein protects mice against invasive group A streptococcal infection* [online]. PloS One. 12(3), [cit. 2017-04-15]. doi: 10.1371/journal.pone.0174464. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5371370/>
19. *Laboratorní příručka Oddělení klinické mikrobiologie*, 2016. [online]. Nemocnice Písek a. s. [cit. 2016-11-05]. Dostupné z: [https://www.google.cz/search?q=%28https%3A%2F%2Fwww.nemopisek.cz%2Fimages%2Fstories%2Fdokumenty%2FMIKROB%2FOKMLaborPrirucka2016.pdf%29&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe\\_rd=cr&ei=TacFWbr5KMmv8weYz564CQ](https://www.google.cz/search?q=%28https%3A%2F%2Fwww.nemopisek.cz%2Fimages%2Fstories%2Fdokumenty%2FMIKROB%2FOKMLaborPrirucka2016.pdf%29&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe_rd=cr&ei=TacFWbr5KMmv8weYz564CQ)
20. MAHON, Connie R., LEHMAN, Donald C., MANUSELIS, G. (eds.), 2015. *Textbook of diagnostic microbiology*. 5th ed. Maryland Heights, Missouri: Elsevier, s. 328-348. ISBN 978-0-323-08989-0.
21. MARTINS, C., DEMARCHI, L., FERREIRA, F., POMERANTZEFF, P., BRANDAO, C., SAMPAIO, R., SPINA, G., KALIL, J., CUNHA-NETO, E., GUILHERME, L., 2017. *Rheumatic Heart Disease and Myxomatous Degeneration: Differences and Similarities of Valve Damage Resulting from Autoimmune Reactions and Matrix Disorganization* [online]. PloS One. 12(1),

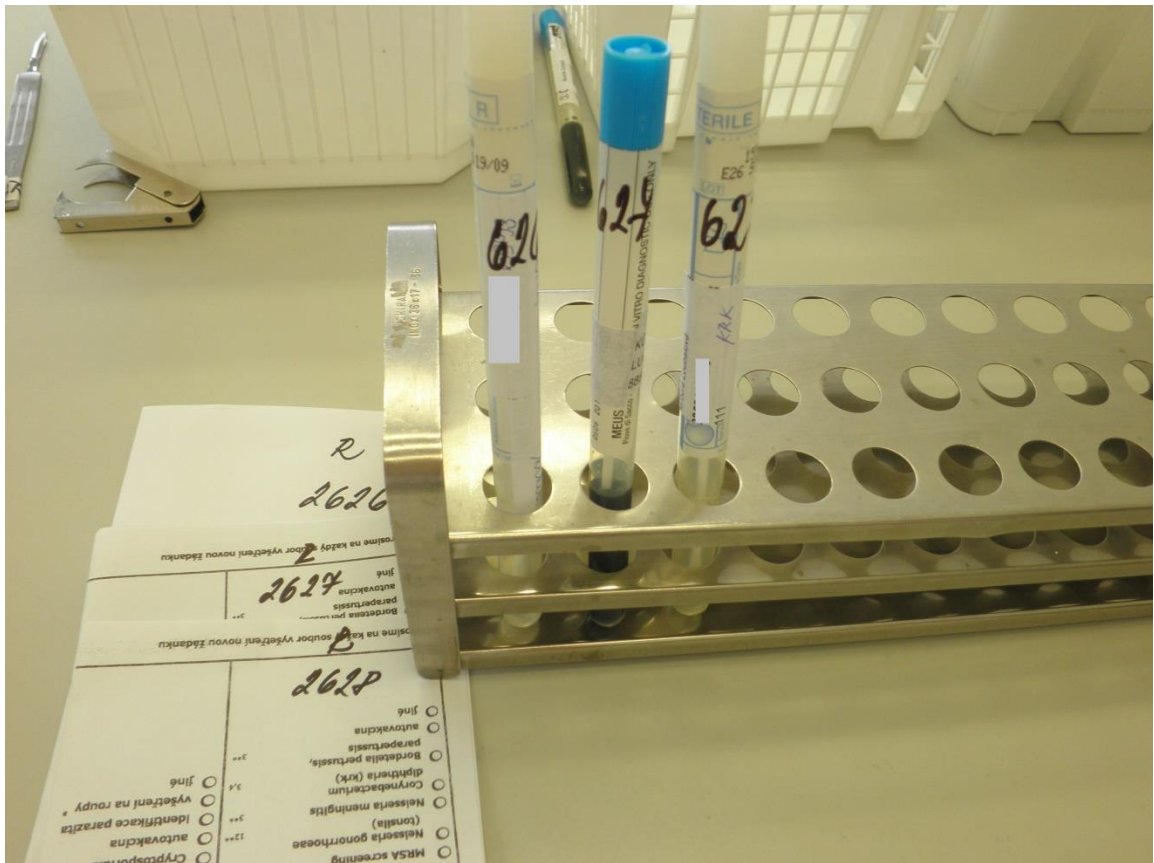


- [cit. 2017-02-03]. doi: 10.1371/journal.pone.0170191. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5266332/>
22. MATĚIČKA, F., BLAŽÍČKOVÁ, S., BOŠÁK, V., 2004. *Imunológia pre poslucháčov FZSP*. Trnava: Slovak Academic Press, 245 s. ISBN 80-89104-40-1
23. MCCLATCHEY, Kenneth D., 2002. *Clinical laboratory medicine*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins., s. 1347-1401. ISBN 0683307517.
24. MELTER, O., MALMGREN, A., 2014. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum. 138 s. ISBN 978-80-246-2414-3.
25. MESKO, D., MARKS, V., 2002. *Differential diagnosis by laboratory medicine: a quick reference for physicians*. New York: Springer-Verlag, s. 935-1099. ISBN 3-540-43057-1.
26. *Očkování*, ©2017 [online]. Praha: 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova. [cit. 2017-03-30]. Dostupné z:  
<http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/ockovani/ockovani.htm>
27. PAOTONU, D., BEATON, A., RAGHU, A., STEER, A., CARAPETIS, J., 2017. *Acute Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease* [online]. NCBI. [cit. 2017-04-15]. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425394/>
28. RYŠKOVÁ, O., 2007. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium*. Praha: Karolinum, s. 95-114. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-0135-9.
29. SHOENFELD, Y., FUČÍKOVÁ T., BARTUŇKOVÁ J., 2007. *Autoimunita: vnitřní nepřítel*. Praha: Grada Publishing, 96 s. ISBN 978-80-247-2044-9.
30. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada Publishing, s 66-76. ISBN 978-80-247-4771-2.
31. *Tabulky EUCAST*, 2017. [online]. [cit. 2017-03-14]. Dostupné z:  
[http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
32. TEPLAN, V., 2010. *Akutní poškození a selhání ledvin v klinické medicíně*. Praha: Grada, s. 111-125. ISBN 978-80-247-1121-8.

33. TESAŘ, V., VIKLICKÝ, O. (eds.), 2015. *Klinická nefrologie*. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, s. 91-165. ISBN 978-80-247-4367-7.
34. VLČEK, J., FIALOVÁ, D., 2014. *Klinická farmacie II*. Praha: Grada, s. 55-71. ISBN 978-80-247-4532-9.
35. VOTAVA, M., 2000. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Brno: Hortus, 407 s. ISBN 80-238-5058-X.
36. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
37. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 350 s. ISBN 80-86850-00-5.
38. *Žádanka na bakteriologické vyšetření*, [online]. Oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek a. s. [cit. 2016-11-05]. Dostupné z: <https://www.nemopisek.cz/index.php/oddeleni/laboratore/28-klinicka-mikrobiologie?showall=&start=2>

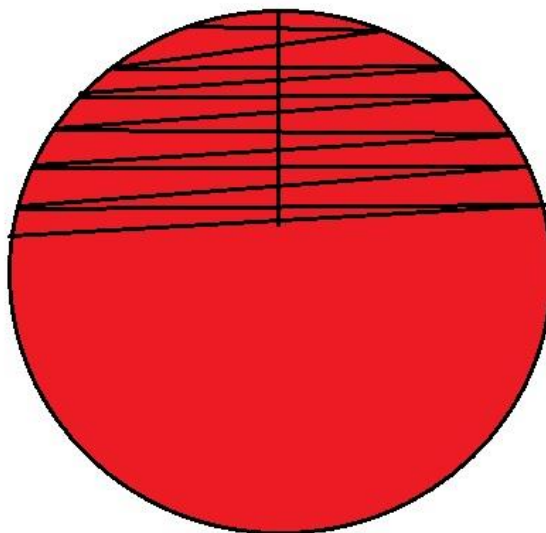


Příloha č. 2: Přidělení unikátního číselného kódu ke každému vzorku



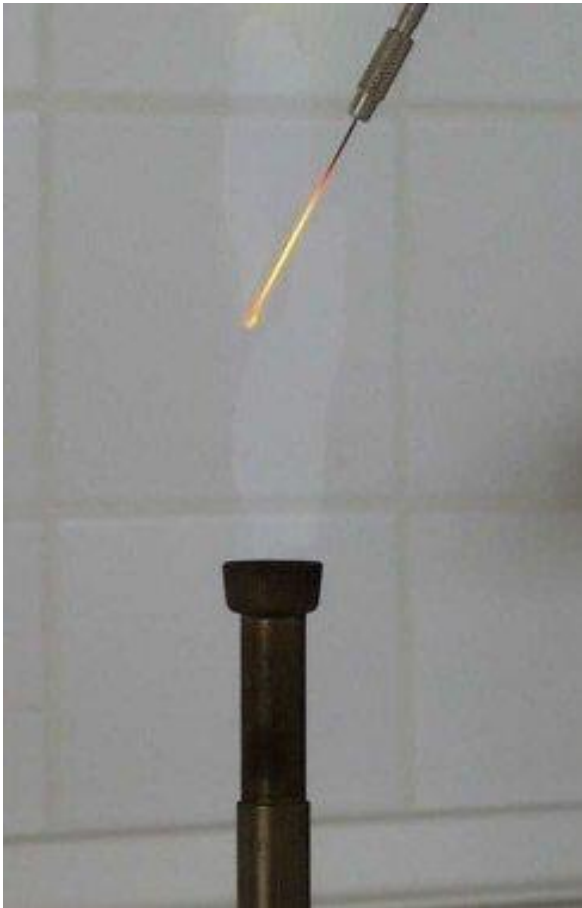
(vlastní zdroj)

Příloha č. 3: Nanesení vzorku na krevní agar



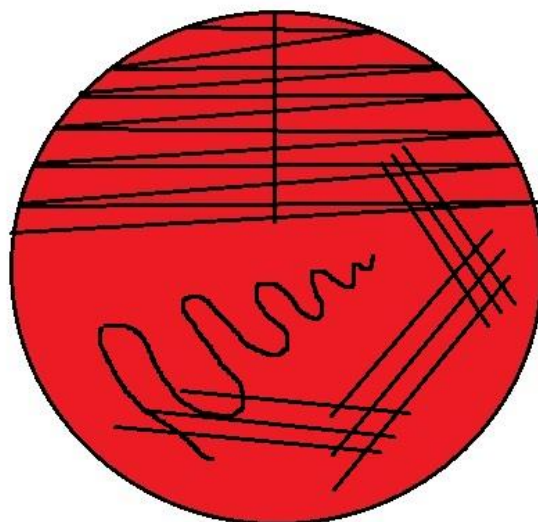
(vlastní zdroj)

Příloha č. 4: Bakteriologická klička nad kahanem



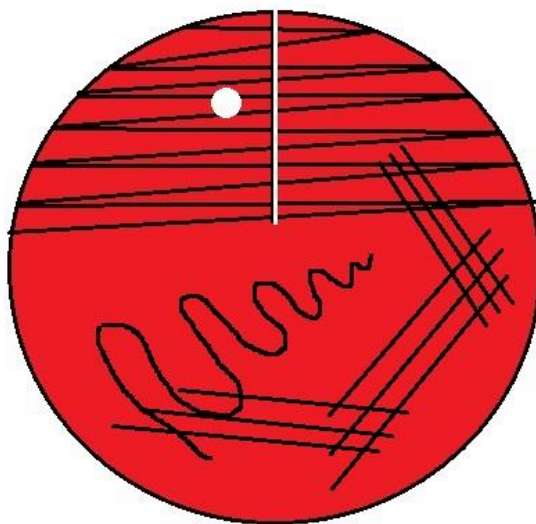
(3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, ©2017)

Příloha č. 5: Rozočkování vzorku pomocí bakteriologické kličky



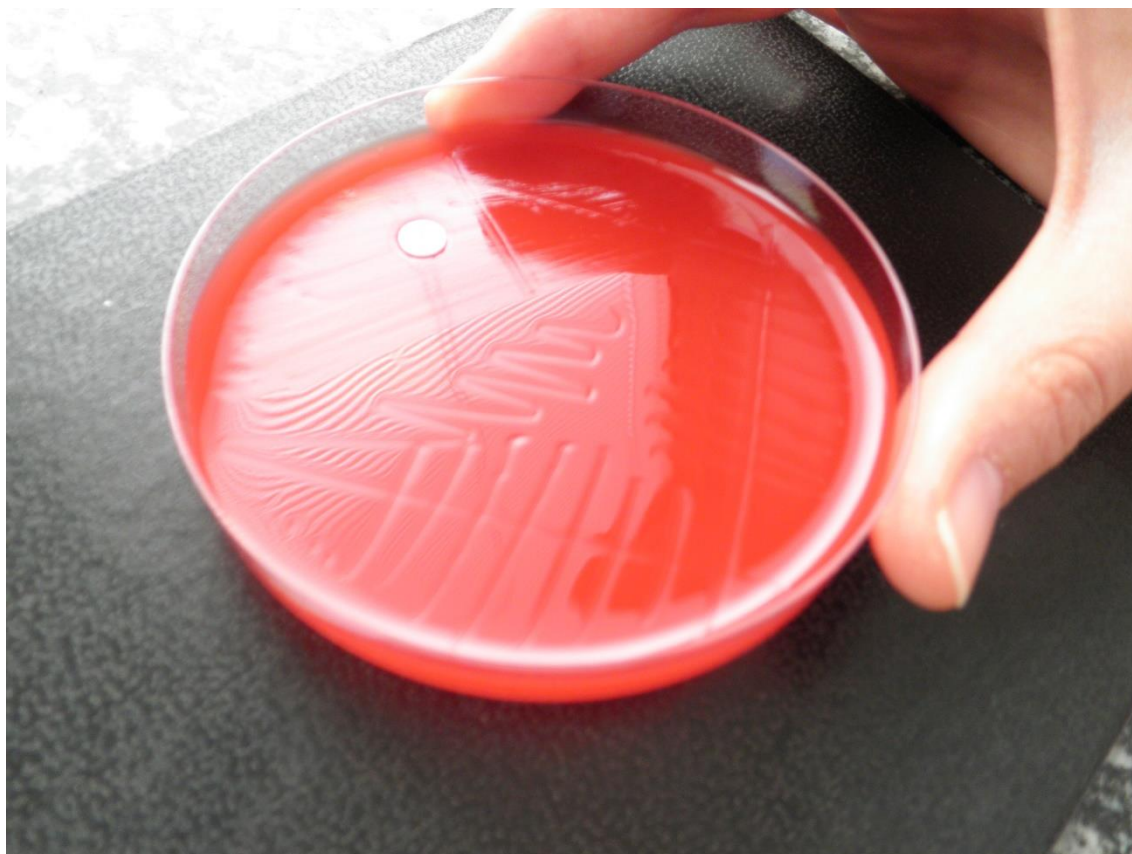
(vlastní zdroj)

Příloha č. 6: Umístění bacitracinového disku a vytvoření stafylokokové čáry



(vlastní zdroj)

Příloha č. 7: Zpracovaný výtěr z krku



(vlastní zdroj)

Příloha č. 8: Termostat



(vlastní zdroj)

Příloha č. 9: Nárůst *Streptococcus pyogenes* na krevním agaru č. 1



(vlastní zdroj)

Příloha č. 10: Nárůst *Streptococcus pyogenes* na krevním agaru č. 2



(vlastní zdroj)

Příloha č. 11: Nárůst *Streptococcus pyogenes* na krevním agaru č. 3



(vlastní zdroj)

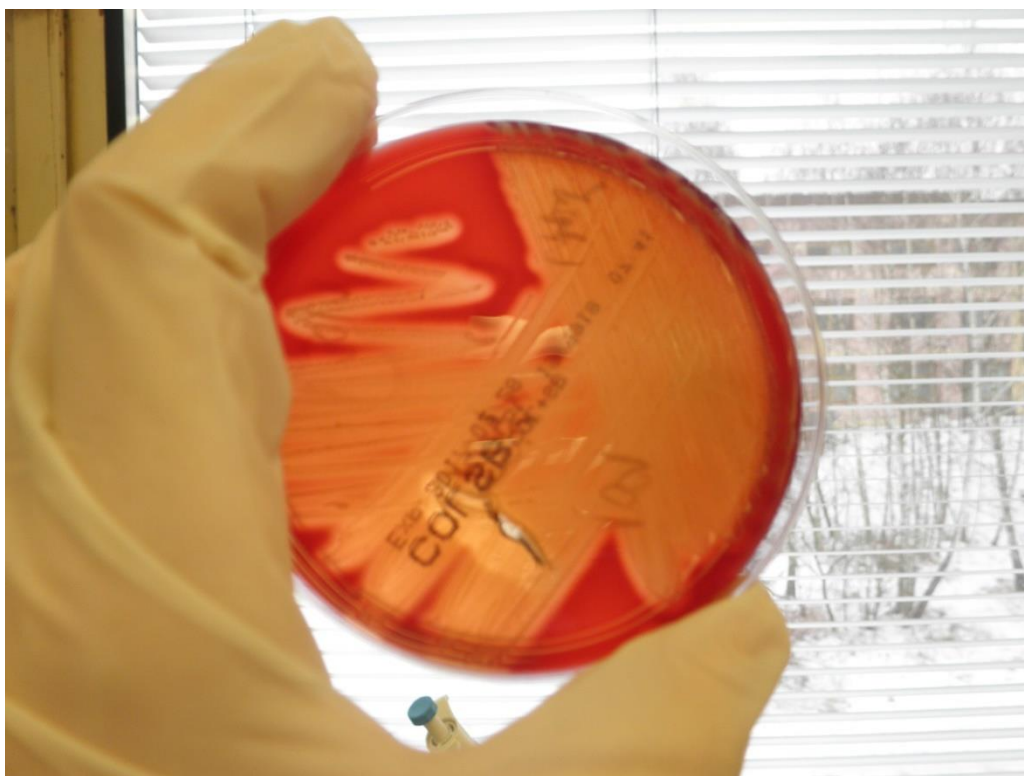


Příloha č. 12: Nárůst *Streptococcus pyogenes* na krevním agaru č. 4



(vlastní zdroj)

Příloha č. 13: Beta-hemolýza



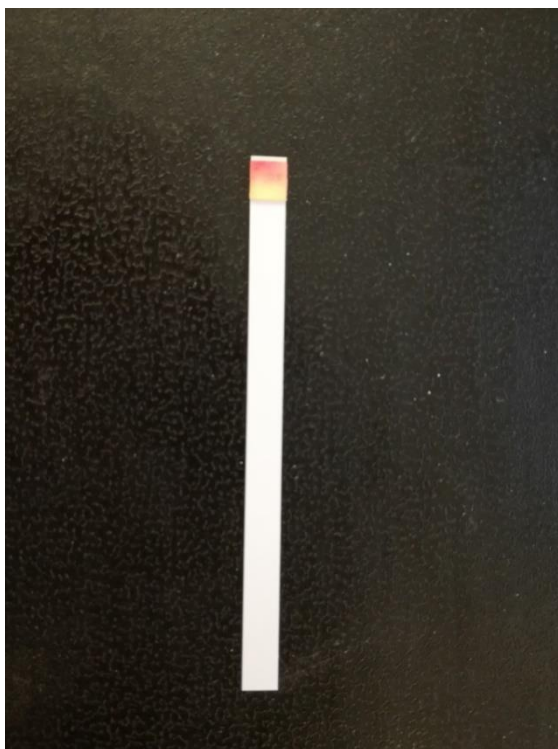
(vlastní zdroj)

Příloha č. 14: Potřeby pro provedení PYR testu



(vlastní zdroj)

Příloha č. 15: Pozitivní PYR test



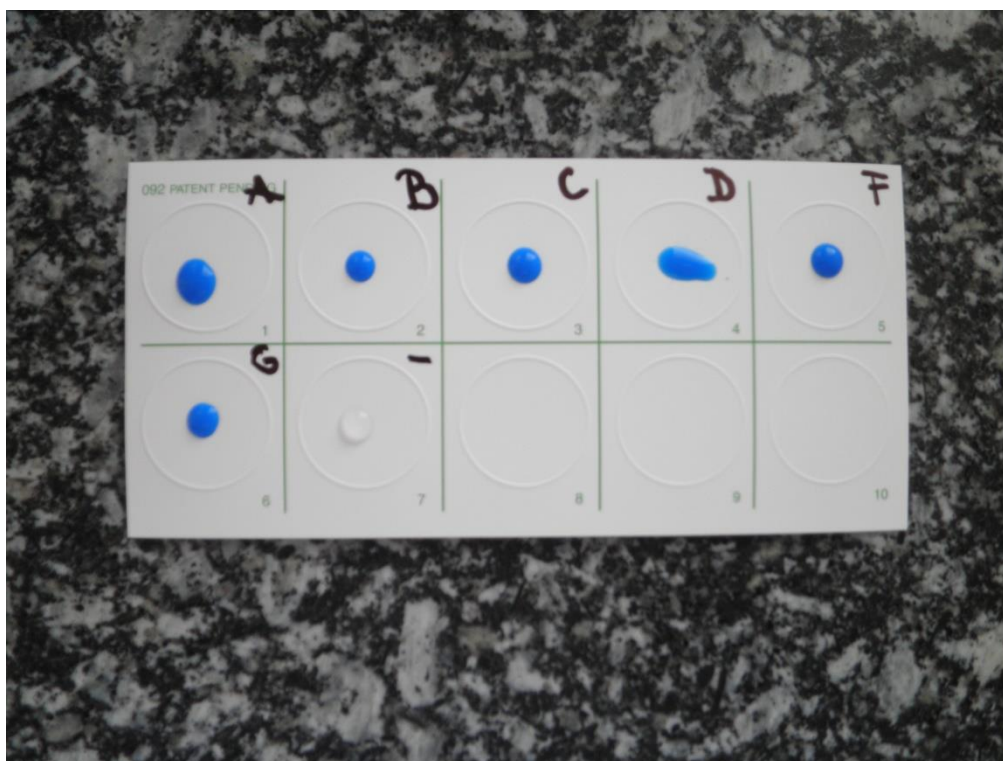
(vlastní zdroj)

Příloha č. 16: Potřeby pro provedení testu latexové aglutinace



(vlastní zdroj)

Příloha č. 17: Krok č. 1 při provádění testu latexové aglutinace



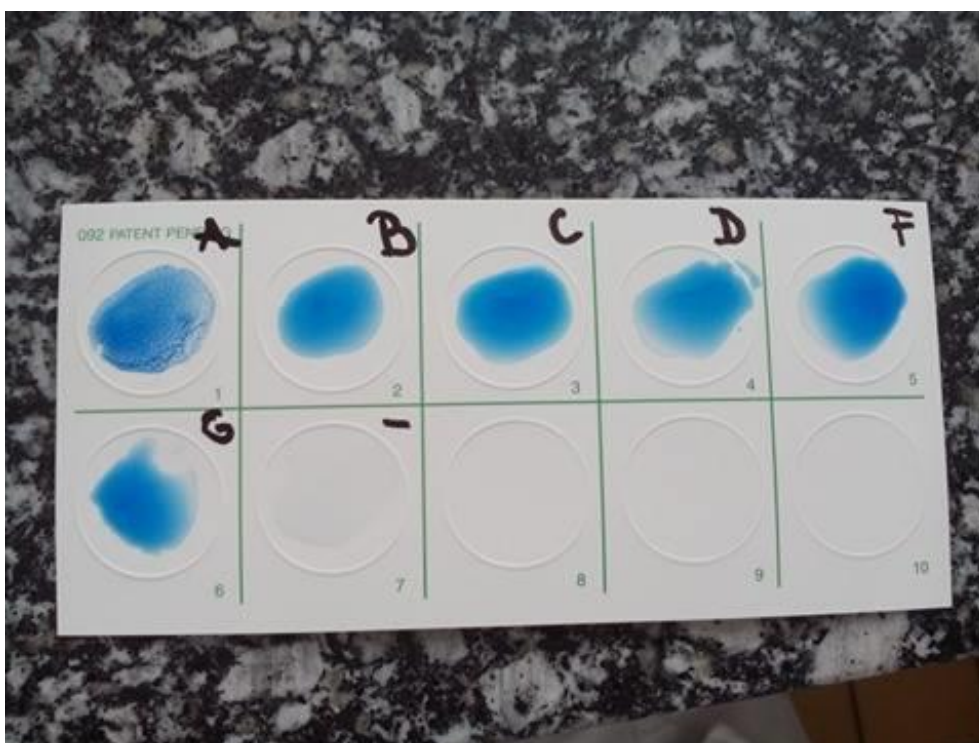
(vlastní zdroj)

Příloha č. 18: Krok č. 2 při provádění testu latexové aglutinace



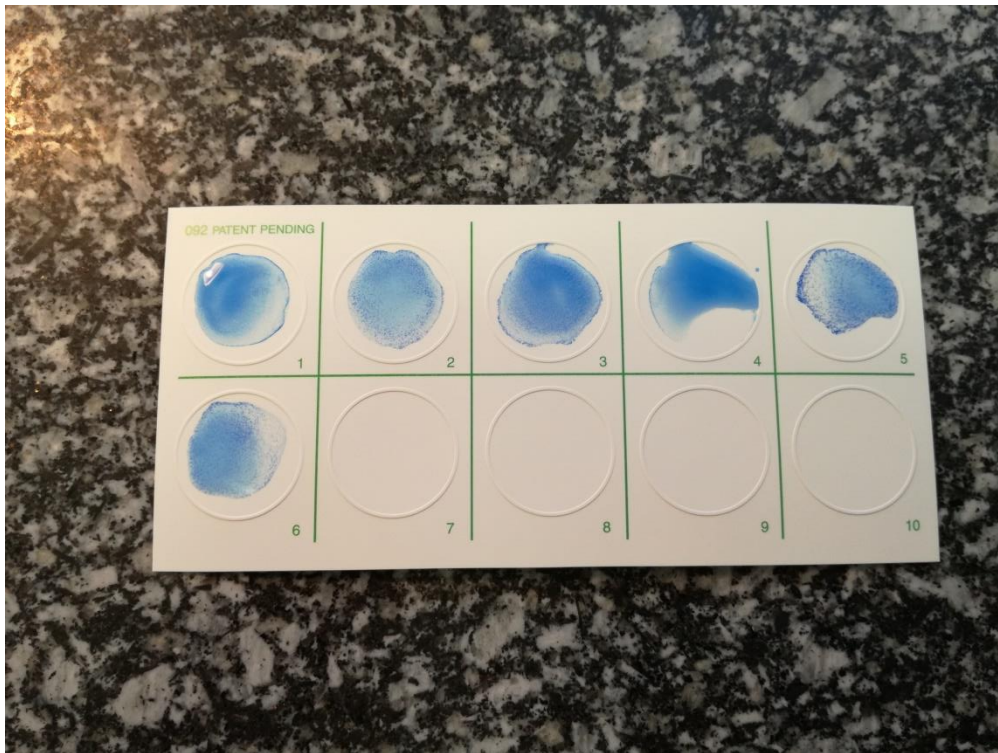
(vlastní zdroj)

Příloha č. 19: Pozitivní reakce s latexovou reagencií skupiny A



(vlastní zdroj)

Příloha č. 20: Pozitivní kontroly testu latexové aglutinace



(vlastní zdroj)

Příloha č 21: Denzitometr



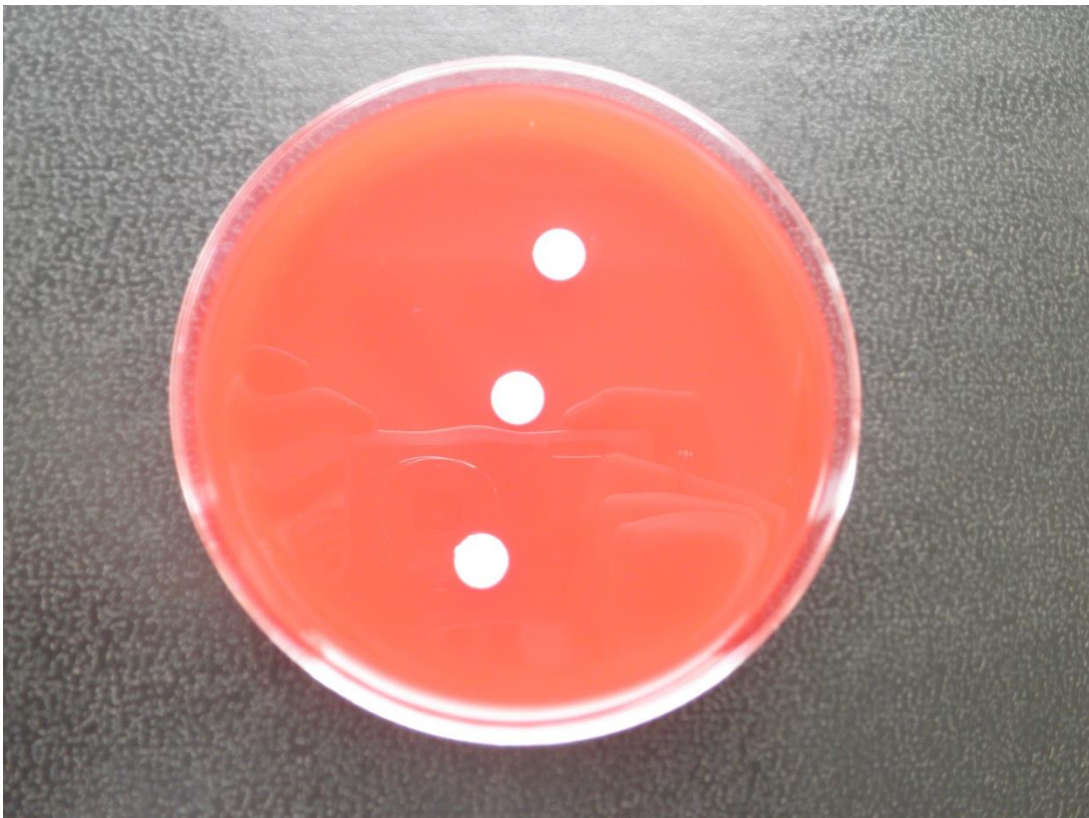
(vlastní zdroj)

Příloha č. 22: Růst *Streptococcus pyogenes* na MH-agaru



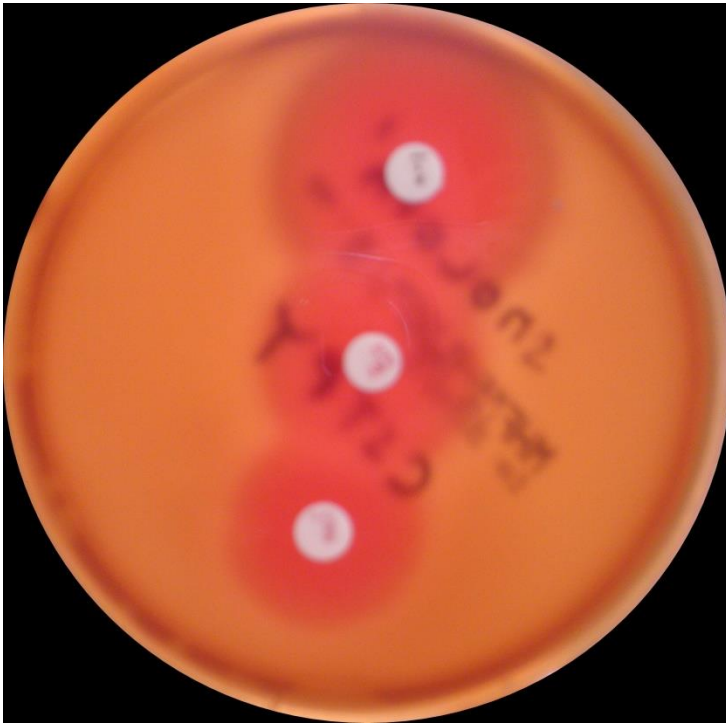
(vlastní zdroj)

Příloha č. 23: Umístění antibiotických disků



(vlastní zdroj)

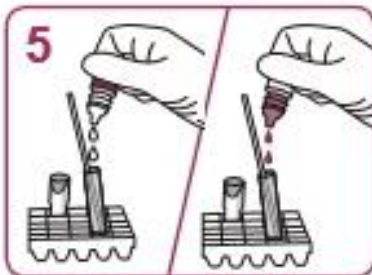
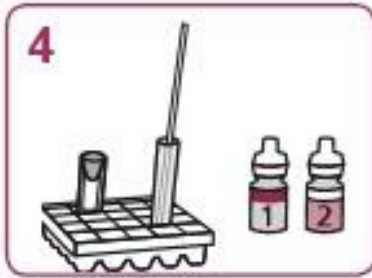
Příloha č. 24: IZ kolem antibiotických disků



(vlastní zdroj)

**Postup měření • Testovací postup**

**Odběr a příprava vzorku • Odber a príprava vzorky**





Příloha č. 26: Pozitivní výsledek testu QuikRead go Strep A



(vlastní zdroj)

## **9 Seznam zkratek**

ASLO= protilátky proti streptolyzinu O

CFU= Colony Forming Units (jednotky tvořící kolonie)

CNS= centrální nervová soustava

IgA= imunoglobulin A

IgG= imunoglobulin G

IZ= inhibiční zóna

MH-agar= Muellerův-Hintonové agar

MIC= minimální inhibiční koncentrace

PEG= polyetylglykol

RADT = rapid antigen detection test

Spe= streptokokové pyrogenní exotoxiny