



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

**Rod *Haemophilus* a jeho laboratorní
vyšetření v současné medicíně**

Vypracovala: Jana Kadlecová

Vedoucí práce: MUDr. Radim Kramář, CSc.

České Budějovice 2014

Abstrakt

Bakalářská práce, kterou jsem vypracovala, je zaměřena na nejhlavnější patogen rodu *Haemophilus*, a to *Haemophilus influenzae*. *H. influenzae* je původcem závažných infekcí, hlavně jeho typ **b**, který je nejvíce virulentním organismem, způsobující invazivní onemocnění hlavně u dětí a starších lidí, např. meningitidu a chronickou obstrukční plicní nemoc.

V teoretické části se věnuji charakteristice rodu hemofilů i klinickým významům nejnámějších druhů vyskytujících se v současné době. Rod *Haemophilus* je aerobní a fakultativně anaerobní gram – negativní bakterie, která je charakteristická svými náročnými požadavky na růst.

K diagnostice byly použity metody, a to test s růstovými faktory jako běžná dlouho uznávaná diagnostická metoda, která rozliší jednotlivé hemofily podle jejich závislosti na růstových faktorech. Jelikož tato metoda je náročná jak finančně, tak i časově, je její zpracování zdlouhavé a nepřesné. Proto dnes díky pokroku technologie byla zavedena novější metoda MALDI – TOF hmotnostní spektrometrie (MS). Svým rozvojem umožňuje snadnější, rychlejší a přesnější diagnostiku i těch nejnáročnějších bakterií, kvasinek a hub. Diagnostika MALDI – TOF MS se vyznačuje nespornou spolehlivostí a nákladovou efektivností.

Jako základní léčebná metoda proti hemofilům se užívá β - laktamová antibiotika, především antibiotikum co-amoxicilin a chloramfenikol. Kromě antibiotické léčby lze dnes vzniku závažných infekcí předejít i očkováním tzv. Hib vakcínou.

V praktické části byly popsány postupy a laboratorní diagnostika hlavního patogenu *H. influenzae* metodou MALDI – TOF MS a testem na růstové faktory v mikrobiologické laboratoři Synlab, czech s.r.o., v Českých Budějovicích. Pro znázornění četnosti výskytu *H. influenzae* v jednotlivých ročních obdobích za rok 2013 byly výsledky získány z laboratorního informačního systému laboratoře ze vzorků dopravených z terénních ordinací od praktických lékařů z Jižních Čech a zpracovány do statistických údajů.

Cílem práce bylo izolovat rod *Haemophilus* z horních cest dýchacích a identifikovat hlavní potenciální patogen tohoto rodu. Dále mým cílem bylo porovnat spolehlivost a náročnost jednotlivých diagnostických metody při jeho určování.

Hypotéza 1: Četnost výskytu *H. influenzae* v roce 2013 závisí na ročním období.

Hypotéza 2: Metoda MALDI-TOF MS je spolehlivou a rychlou metodou pro identifikaci rodu *Haemophilus*, na rozdíl od rutinního diagnostického testu s růstovými faktory.

Z výsledků lze usoudit, že četnost výskytu *H. influenzae* v roce 2013 závisí na ročním období. Hemofily jsou náročné a citlivé bakterie na kultivaci a vyžadují ke svému růstu optimální podmínky. V případě přítomnosti virového onemocnění v tomto období se incidence výskytu zvyšuje a může tak zásadně ovlivnit průběh léčby.

Při porovnání použitých metod se mi podařilo potvrdit i hypotézu 2 a prokázat, že metoda MALDI – TOF MS je užitečná v diagnostice. Je to metoda nenáročná a díky rychlému zpracování vzorku umožní získat výsledek během několika minut.

Závěrem práce lze tedy říci, že metoda MALDI – TOF MS je rychlý, spolehlivým a výkonným diagnostickým nástrojem pro identifikaci mikroorganismů. Díky rychlé odezvě a minimálním nákladům na spotřební materiál na vzorku ve srovnání s konvenčními identifikačními metodami se MALDI – TOF MS stal možným efektivním nástrojem taxonomické klasifikace a mikrobiologické studie.

Klíčová slova: rod *Haemophilus*, *H. influenzae*, MALDI – TOF MS, test s růstovými faktory, β – laktamová antibiotika

Abstract

My bachelor's thesis focuses on the most major pathogen of the genus named *Haemophilus*, and *Haemophila influenzae*. *H. influenzae* is an originator of more serious infections, mainly its type b, which is the most virulent organism, causing invasive diseases mainly with children and older people. It causes mainly meningitis and chronic obstructive pulmonary disease.

In the theoretical part of my bachelor's thesis I write about the genus *Haemophilus* and clinic significances of the most famous species which occur at present. The genus *Haemophilus* is an aerobic and a facultative aerobic gram – that means it is a negative bacteria, which is characteristic for its arduous requests for accretion.

I used some methods for the diagnosis. I used the following methods – a test with growth factors, which is a common diagnostic method, which distinguishing *Haemophilus* according to their addiction to the growth factors. This method is financially very demanding and currently the reason being why its results are not so accurate. But thanks to a new technology a more modern method called MALDI – TOF weight spektronomie (MS) was found, which is easier, quicker and more accurate than the first one. MALDI – TOF enables a diagnosis of the most demanding pieces of bacteria, yeast and mushrooms. The MALDI – TOF diagnosis is characterized by undisputed reliability and cost – effectiveness. β – Lactam antibiotics, mainly antibiotics - co-amoxicilin and chloramfenikol are used as treatment methods against *Haemophilus*. Against serious infections can one protect themselves with a vaccination – the Hib vaccination.

In the practical part of my bachelor's thesis I described some processes and laboratory diagnostics of the pathogen *H. influenzae* by methods MALDI – TOF MS and by the Test for growth factories in a microbiological laboratory named Synlab, czech s.r.o., in České Budějovice. The results of how frequently *H. influenzae* occurred in the year 2013, were gained from of the previously mentioned laboratory information system and were transported into the other laboratory from a field office of general

practitioners. The other aim of my bachelor's thesis was to compare severity and of each method.

HYPOTHESIS 1: The frequency of *H. influenzae* in the year 2013 depends on a season.

HYPOTHESIS 2: The MALDI – TOF MS method is reliable and fast for identification of the genus *Haemophilus*. The Test with growth factories is not so reliable and fast.

From the results it is obvious that the frequency of *H. influenzae* depends on the season. *Haemophilus* are very demanding and sensitive bacteria for cultivation and they need optimal conditions for their accretion. In this season the viral diseases increase and they can affect the process of the treatment.

During the comparison of these two methods I managed to prove that the second hypothesis MALDI – TOF is useful in a diagnosis. This method is not demanding. And the result can be obtained in a few minutes.

At the end of my thesis it can be said that the MALDI – TOF MS method is fast, reliable and an efficient diagnosis tool for identification of microorganisms. MALDI – TOF MS has become an effective method for taxonomic classifications and microbiological studies. The MALDI – TOF MS method is fast and there are minimal costs for consumables in samples.

Keywords: the genus *Haemophilus*, *H. influenzae*, the MALDI – TOF MS method, a Test with growth factors, β – lactam antibiotics

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 11. 8. 2014

.....

(Jana Kadlecová)

Poděkování

Touto formou bych chtěla vyjádřit poděkování svému vedoucímu práce panu MUDr. Radimovi Kramářovi, CSc. za jeho odborné vedení, cenné rady, čas a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům mikrobiologické laboratoři Synlab czech, s.r.o., za jejich ochotu a vstřícnost. A jako poslední bych chtěla poděkovat své rodině za nesmírnou podporu a trpělivost při studiu.

Obsah

1. Úvod.....	12
2. Vymezení základních pojmů	14
3. Teoretická část	14
3.1 Historie.....	14
3.2 Rod Haemophilus.....	15
3.3 Morfologie a fyziologie	15
3.4 Klinický význam nejznámějších druhů.....	16
3.4.1 Haemophilus influenzae	16
3.4.2 Haemophilus parainfluenzae	18
3.4.3 Haemophilus haemolyticus	19
3.4.4 Haemophilus ducreyi.....	20
3.4.5 Haemophilus aegyptius	20
3.4.6 Haemophilus aphrophilus.....	21
3.4.7 Ostatní hemofily	21
3.5 Patogeneze a patogenita	21
3.6 Diagnostika	22
3.7 Terapie	23
3.7.1 Antimikrobiální léčba.....	23
3.7.2 Prevence	25
4. Závěr teoretické části	25
5. Praktická část	26
5.1 Stanovení cíle výzkumu	26

5.2 Definice hypotéz	27
6. Metodika výzkumu	28
6.1 Kvantitativní výzkum.....	28
6.2 Charakteristika sběru dat.....	28
6.2.1 Použité metody a postupy.....	28
6.2.2 Odběr vzorku, transport a skladování organismu.....	29
6.3 Kultivace	30
6.3.1 Krevní agar (KA).....	30
6.3.2 Čokoládový agar (ČA)	31
6.4 Test s růstovými faktory	34
6.4.1 Postup umístění růstových disku na MH agar.....	34
6.5 MALDI – TOF	36
6.5.1 MALDI Biotyper	37
6.5.2 Postup přípravy vzorku k analýze	39
7. Výsledky	40
7.1 Kvantitativní výzkum.....	40
7.1.1 Četnost výskytu <i>H. influenzae</i> za rok 2013.....	40
7.1.2 Výsledky jednotlivých metod.....	43
7.1.3 Srovnání použitých metod.....	44
8. Diskuze	46
9. Závěr	48
10. Seznam použitých zdrojů.....	50
11. Přílohy.....	53

Seznam použitých zkratk

NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
KA	Columbia krevní agar s 5 % ovčí krve
CO₂	oxid uhličitý
HCD	horní cesty dýchací
DCD	dolní cesty dýchací
NTHi	netytizovatelný <i>H. influenzae</i>
Hib	<i>H. influenzae</i> typu b
PRP	polyribosiribitol fosfát
URT	urogenitální trakt
DNA	deoxyribonukleová kyselina
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
IgA	imunoglobulin třídy A
MALDI – TOF MS	Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
CRP	C – reaktivní protein
ATB	antibiotika
API NH	system pro identifikaci neisserií a hemofilů
β – NAD	beta – nikotinamidadenindinukleotid
β – laktamová antibiotika	beta – laktamová antibiotika

Seznam použité lékařské terminologie

Pneumonie	zápal plic
Otitis media	zánět středního ucha
Sinusitida	zánět vedlejších dutin nosních
Tracheobronchitida	zánětlivá infekce dolní cest dýchacích
Endokarditida	zánět nitroblány srdeční
Septická artritida	zánět kloubů
Perikarditida	zánět osrdečníku
Konjunktivitida	zánět očních spojivek
Epiglottitida	zánět hrtanové přiklopky
Meningitida	infekční zánět mozkových a míšních plen

1. Úvod

Zvolila jsem si toho téma bakalářské práce, protože chci prozkoumat spolehlivost a náročnost zpracování materiálu z *H. influenzae* novějšími metodami a porovnat je s běžnými diagnostickými postupy. Dále mě zajímalo, jaký byl výskyt *H. influenzae* za rok 2013 v oblasti Jižních Čech, zda výskyt tohoto hemofilu závisí na ročním období.

Rod *Haemophilus* je členem čeledi *Pasteurellaceae*, který se dnes považuje za původce závažných infekcí ovlivňující člověka. Některé druhy se projevují širokou škálou patogenity od život ohrožující invazivní onemocnění dýchacích cest až po nepatogenní, kde mimo jiné působí jako komenzální flóra na sliznici nosohltanu např. *H. parainfluenzae*. Jsou to malé aerobně a fakultativně anaerobní gram-negativní bakterie, ve tvaru kokobacilu nebo krátké tyče, které se vyznačují náročnými požadavky na růst. Vyžadují ke svému růstu růstové faktory, které nám umožní rozlišit jednotlivé druhy, podle jejich závislosti na těchto faktorech. (1)

Cílem mého zkoumání bude izolace rodu *Haemophilus* z horních cest dýchacích a identifikace nejdůležitějšího druhu, a sice *H. influenzae*, který je pokládán za hlavní obligatorní patogen tohoto rodu. Nejvíce virulentním druhem je *H. influenzae* typu **b**, který je ohniskem závažných infekcí především u dětí a starších lidí. Tento druh způsobuje invazi do krevního řečiště a na meningy, kde může vyvolat závažná onemocnění. U dětí to mohou být meningitidy a záněty středního ucha a u dospělých např. chronická obstrukční plicní nemoc. Rozvoj těchto onemocnění dochází hlavně u infikovaných jedinců, především u těch co prodělali nějaké virové onemocnění, a je přenášeno kapénkovou infekcí.

Ostatní druhy hemofilů, způsobují též závažné onemocnění. *H. parainfluenzae* krom toho, že se vyskytuje jako komenzální obyvatel dutiny ústní spolu s *H. haemolyticus*, který je dále i v urogenitálním traktu, může působit i jako oportunní patogen způsobující systémové onemocnění např. endokarditidu. Dále jako jediný patogen tohoto rodu, který způsobuje sexuálně přenosné onemocnění tzv. „Měkký

vřed“ (Ulcus molle) se považuje *H. ducreyi*, který se vyskytuje převážně v rozvojových zemích.(2)

Každé z výše uvedených onemocnění má svou vlastní diagnostiku, která většinou spočívá v mikrobiologickém vyšetření určitého biologického materiálu. Ve své práci se budu hlavně zabývat diagnostikou nejhlavnějšího patogenu *H. influenzae*, který je náročný na kultivaci a potřebuje ke svému růstu růstové faktory a speciální podmínky. Jako hlavní metody, které použiji, byl *test s růstovými faktory* jako běžná diagnostická metoda, která poskytne rozlišení *H. influenzae* od jiných druhů podle závislosti na růstových faktorech, a novější metodu MALDI – TOF hmotnostní spektrometrii (MS). Metoda MALDI – TOF MS svým rozvojem umožnila snadnější a rychlejší diagnostiku a dokáže už dnes potenciálně nahradit nebo doplnit běžné identifikační techniky. (25)

Ve své práci chci též popsat možné způsoby terapie. Základní léčebnou metodou jsou β – laktamová antibiotika, mezi které zařazujeme hlavně skupinu aminopenicilinů, a to nejčastější antibiotikum co–amoxicilin. Ten se užívá především u zánětů horních a dolních cest dýchacích. Dále z řady amfenikolů antibiotikum chloramfenikol, který se podává při těžkých hemofilových sepsích např. meningitidy. Kromě antibiotické léčby, lze dnes vzniku závažného onemocnění předejít i očkováním tzv. Hib vakcínou.(14)

2. Vymezení základních pojmů

Ve své bakalářské práci se opírám o odborné termíny, které je nutno vysvětlit. Jelikož se budu zabývat nejznámějším druhem rodu *Haemophilus* a vyšetřovat ho dle stanovených mikrobiologických postupů, bude nutné vhlédnout do problematiky oboru Mikrobiologie.

Rod *Haemophilus* - je bakterie gram - negativní kokobacilus, která způsobuje nejrůznější infekce např. meningitidy, mimo jiné se vyskytuje i jako přirozená mikroflóra na sliznici nosohltanu.(3)

H. influenzae – se považuje jako hlavní patogen rodu *Haemophilus*, především jeho typ **b**, který se považuje za nejvíce virulentní v této skupině.(3)

Test s růstovými faktory – je to rutinní diagnostika, která se využívá pro rozlišení jednotlivých druhů, zejména nejhlavnějšího patogenu *H. influenzae*, který využívá růstové faktory pro svůj optimální růst a odlišení od jiných druhů rodu *Haemophilus*.(2)

MALDI – TOF – moderní metoda hmotnostní spektrometrie, která umožňuje rychlou a přesnou identifikaci bakterií, kvasinek a hub izolovaných z biologického materiálu.(27)

3. Teoretická část

3.1 Historie

Jako první kdo popsal a pozoroval rod *Haemophilus*, byl Robert Koch. V roce 1889 – 1892 byl druh *Haemophilus influenzae* považován mylně za původce chřipky u chřipkové pandemie, která v těchto letech panovala, a po čtyřiceti letech byl zařazen pouze mezi superinfekce, které se vyskytují na poškozených místech způsobených virem chřipky. Rod *Haemophilus* byl tedy poprvé zařazen do čeledi *Pasteurellaceae* v roce 1984.(1)

3.2 Rod *Haemophilus*

Rod *Haemophilus* je členem čeledi *Pasteurellaceae*, do které jsou zařazeny druhy hemofilů, které v současné době působí jako patogen ovlivňující člověka. Do tohoto rodu dnes zahrnujeme i dalších sedm druhů a to jsou: *H. influenzae*, *H. aegyptius*, *H. ducreyi*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*.(2) Jsou to gram – negativní kokobacily, které sdílejí společné ultrastrukturální rysy s jinými gram – negativními patogenními bakteriemi. Rod *Haemophilus* obsahuje řadu druhů, které způsobují nejrůznější infekce, mimo jiné se i přirozeně vyskytují na sliznici nosohltanu, kde se považují za normální mikroflóru. Tento rod se vyznačuje závislostí na požadavky faktorů krevních derivátů během růstu, který dal rodu svůj název. Tyto faktory jsou obsaženy v pūdách obsahující ovčí krev, které jsou dnes využívány v rutinní diagnostice, např. čokoládový a krevní agar.(3) Běžně se v klinických mikrobiologických laboratořích setkáváme s *Haemophilus influenzae* jako hlavního patogenu a některými dalšími druhy, které se projevují širokou škálou patogenity, od život ohrožující invazivních onemocnění dýchacích cest až po nepatogenní, které se nachází jako komenzální flóra na sliznici.(5)

3.3 Morfologie a fyziologie

Členové rodu *Haemophilus* jsou malé, nepohyblivé, bez sporulací, pleomorfní, aerobní a fakultativně anaerobní gram – negativní bakterie s náročnými požadavky na růst. Buňky tohoto rodu mají tvar kokobacilu nebo krátké tyče. Jejich buněčná stěna připomíná jiné gram-negativní bakterie, obsahují méně mastných kyselin, které se vyskytují u ostatních členů *Pasteurellaceae* např. *Enterobacteriaceae*. Rod *Haemophilus* jsou fakultativně anaerobní bakterie vyžadující faktory pro růst, faktor X (hemin) je protoporfyrin IX, který vznikl jako metabolický meziprodukt v biosyntéze heminu a faktor V, který se skládá z nikotidového komplexu jako NAD nebo NADP.(2) Požadavek na tyto složky se liší v závislosti na druhu, *H. influenzae*, *H. haemolyticus* a *H. aegyptius* vyžadují faktory X a V, *H. parainfluenzae* a *H. parahaemolyticus* vyžadují pouze faktor V a *H. ducreyi* spolu s *H. aphrophilus* rostou jen v oblasti kolem faktoru X.(4)

Organismy v rámci rodu *Haemophilus* obvykle rostou na čokoládovém agaru, kde produkují kolonie, které jsou hladké s plochým nebo vypouklým tvarem. Jsou nepigmentované nebo lehce nažloutlé a v průměru od 0,5 do 2,0 mm. Některé druhy jsou schopny produkovat beta-hemolýzu, např. *H. influenzae*, *H. haemolyticus*. Nárůstu hemofilu může být dosaženo i na KA s obsahem 5 % ovčí krve za vytvoření tzv. „satelitizmu“. Při testu se na předem hemofilem naočkovaném KA nanese čára *Staphylococca aureae*, který obsahuje hemolysin, ten způsobí, že erythrocyty na povrchu agaru zhemolyzují a vytvoří tak beta-hemolýzu. V důsledku lýzy erythrocytů dochází k uvolnění heminu do média a vytvoří se tzv. „satelitový fenomén“. K optimálnímu růstu dochází při teplotě 35 až 37°C ve vlhkém prostředí a v atmosféře obohacené o 5 až 7% CO₂. Za těchto podmínek většina druhů *Haemophilus* roste v průběhu 24 až 48 hodin.(2)

Druhy *Haemophilus*, krom *H. ducreyi*, obvykle kvasí širokou škálu různých biochemických substrátů, zejména fermentace glukózy, sacharózy, laktózy, manózy a xylózy jsou užitečnou charakteristikou v určování druhu organismů v tomto rodu. *H. influenzae* produkuje jeden z šesti různých opouzdřených nebo nepouzdřených polysacharidů a na základě tvorby tohoto pouzdra je druh rozdělen do šesti serotypů označených od **a** až **f**.(2) Hemofily lze nalézt i v rámci komenzální bakteriální flóry na povrchu sliznice HCD u mnoha zdravých jedinců.(6)

3.4 Klinický význam nejznámějších druhů

3.4.1 Haemophilus influenzae

Název „*influenzae*“ získal z už dříve zmíněné virové chřipky, která panovala v 19. století a byl považován zprvu za jejího původce. Dnes je *H. influenzae* pokládán za hlavní patogen, který je rozdělen na opouzdřené a neopouzdřené druhy, které se jsou jinak označovány jako netypizovatelný *H. influenzae* (NTHi). Opouzdřené druhy lze rozdělit ze šesti různých kapsulárních serotypů (**a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**).(7) Antigen typu **b** je nejvíce virulentní v této skupině; 95 % způsobuje invazi do krevního řečiště a na meningy u dětí od 6 měsíců do 2 let.(3) NTHi jsou spojeny s běžnými pediatrickými chorobami, včetně zánětu středního ucha u dětí a zhoršující se chronickou obstrukční

plicní nemocí u dospělých (CHOPN).(7) Ohniskem infekce typu **b** se vyskytuje zvláště ve školkách a centrech péče o děti. Protilátky proti Hib pouzdra hrají hlavní roli v poskytnutí imunity a jsou získány vakcínou konjugovaného *H. influenzae* typu **b**, který vyvolá ochranu tím, že indukuje tvorbu těchto protilátek proti polyribosilribitolfosfátu (PRP). Novorozenci mají nízké riziko infekce a to díky přítomnosti mateřských protilátek získaných od matky. Pokud tyto transplacentární protilátky proti PRP ubývají, je u dětí velké riziko vzniku invazivního onemocnění způsobené *H. influenzae* např. meningitidy a epiglotitidy. *H. influenzae* typ **b** se šíří z jednoho člověka na druhého přímým kontaktem nebo prostřednictvím sekretů případně aerosolem.(3) Druhy *H. influenzae* jsou na základě produkce indolu, ornitin dekarboxylázy a ureázy rozděleny dále do osmy biotypů, Nejčastěji se vyskytují biotypy I, II a III.(1) Většina hemofilů typu **b** spadají do biotypů I nebo II, zatím co neopouzdřené druhy patří do biotypů II až VI.(3)

biotyp	indol	ureasa	ornithindekarboxylasa
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
VI	-	-	+
VII	+	-	-
VIII	-	-	-

Obrázek 1 Biotypy *H. influenzae* (1)

Legenda: pozitivní (+), negativní (-)

Mezi respirační infekce způsobené neopouzdřenými druhy patří sinusitidy, otitis media, akutní tracheobronchitidy a pneumonie. Dalším závažným onemocněním jsou

akutní epiglotitidy, které se častěji vyskytují u dětí než u dospělých, a to v důsledku snížení hladiny mateřských protilátek. Šíření onemocnění je velmi rychlé, projevující se vysokou teplotou a výrazně stoupající bolestí v krku.(3) Bránou vstupu je sliznice hltanu, odkud se hemofily dostávají přes kapiláry do krevního řečiště a na meningy. Pro růst vyžaduje faktor X i V a rostou na čokoládovém agaru, který oba tyto faktory obsahuje.(6)

3.4.2 *Haemophilus parainfluenzae*

Haemophilus parainfluenzae je pro člověka komenzál, který může být příčinou závažných onemocnění.(8) Člen rodiny *Pasteurellaceae* je gram-negativní kokobacilus, který je opakovaně rozpoznán, jako normální mikroflóra nosohltanu a horních cest dýchacích lidského hostitele. Jeho požadavkem na růst je exogenní NAD, kterým se odlišuje od *H. influenzae*, který vyžaduje pro svůj růst hemin a NAD. Kultivace tohoto organismu je v klinických laboratořích obtížná a jeho identifikace na úrovni druhu trvá týden a déle. *H. parainfluenzae* se snadněji kultivuje odsátím kapaliny přepravované v krevních kultivačních láhvích. Pokud je kultura β -laktamázy negativní, široké spektrum polymerázové řetězové reakce na tkáňových vzorcích lze použít k identifikaci organismu během několika hodin.(9)

Tento hemofil je uznáván jako oportunní patogen způsobující systémové onemocnění se spektrem podobným jako netypizovatelný *Haemophilus influenzae* (NTHi), včetně endokarditidy, meningitidy a bakteriémie. Byl také izolován ze sputa u pacientů s CHOPN, avšak jeho role není zcela objasněna u akutních a chronických plicních infekcí, a proto je dnes za původce tohoto onemocnění považován pouze NTHi. Nicméně je přínosem tohoto druhu v patogenezi chronických onemocnění plic a stejně jako ostatní členové rodu, včetně NTHi je izolován z nosohltanu.(10)

Mezi závažné onemocnění, které způsobuje je endokarditida, její průběh je velmi agresivní, což může vést k srdečnímu selhání, diseminované intravaskulární koagulopatii a multiorgánovému selhání, navzdory vhodným antibiotikům a chirurgickým zákrokům.(8) Krom toho, že je *Haemophilus parainfluenzae* je komenzálním obyvatelem dutiny ústní a dýchacích cest, sídlí také i v trávicím a urogenitálním traktu. Přesto však někdy může způsobit oportunní infekce, které vedou

k septické artritidě, osteomyelitidě a hnisavé perikarditidě. Septická artritida z acromioklavikulárního kloubu (AC) je vzácná u osob s příznaky, které zahrnují zarudnutí, otok a bolesti nad AC, horečkou a omezeným pohybem ramene. *H. parainfluenzae* není jediným zdrojem této infekce, jako společným původce byly zmíněny i druhy *Staphylococcus* a *Streptococcus*.(11) Protože *H. parainfluenzae* je náročný na kultivaci a může způsobit hnisavou perikarditidu, přesto je obtížné jej v kultuře izolovat. Hnisavá perikarditida je proces, onemocnění, které je obvykle popisováno jako sekundární infekce z primární oblasti v dýchacím traktu. Tento stav je spojen s respiračními chorobnými procesy, jako jsou zápal plic nebo hnis v tělních dutinách (empyém), což může být následek endokarditidy, poranění hrudníku nebo hematogenní šíření infekce z jiné oblasti těla. Proto by mělo být u pacienta s příznaky hnisavé perikarditidy zvažena přítomnost *H. parainfluenzae*. Definitivní diagnóza závisí na vysokém stupni podezření a na pečlivé mikrobiologické analýze, např. polymerázové řetězové reakci.(9)

3.4.3 Haemophilus haemolyticus

Tak jako ostatní výše popsané druhy, tak i *H. haemolyticus* je součástí mikroflóry nosohltanu a urogenitálního traktu. Flóru urogenitálního traktu (URT) sdílí spolu s *Haemophilus parainfluenzae* a *Haemophilus parahaemolyticus*. Tyto druhy jsou si fylogeneticky příbuzné, ale prakticky apatogenické. Celkem *Haemophilus* druhy tvoří asi 10 % z kultivované bakteriální flóry z URT. Biochemická identifikace metodou růstových faktorů, je založena na využití skutečnosti, že *H. influenzae* postrádá enzymatickou schopnost převést δ -aminolevulovou kyselinu (ALA) na protoporfyrin, a proto závisí na faktoru X pro růst. Tato metoda, ale nedokáže rozlišit od sebe *H. haemolyticus*, který rovněž roste na faktoru X i V, od *H. influenzae*. Rozlišování mezi nimi je velmi obtížné, proto většina izolovaných *H. haemolyticus* vede k alfa-hemolýze na koňském, kravském nebo králičím KA. Metoda růstových faktorů se zdá být nedostačující pro rozlišení *H. haemolyticus* od *H. influenzae*, a proto se dnes využívají už mnohem sofistikovanější, pracovně náročné a drahé molekulární postupy, jako jsou sekvenční analýza ribozomálního DNA, multilokusová analýza, DNA – DNA hybridizace a MALDI – TOF MS.(12)

3.4.4 *Haemophilus ducreyi*

Je původce sexuálně přenosného onemocnění, které se vyznačuje tvorbou tzv. „Měkkého vředu“ (*Ulcus molle*). Projevuje se vznikem jednoho bolestivého genitálního vředu, který je provázen zvětšením inguinálních lymfatických uzlin, vyskytující se ve 2 až 7 dnech po expozici. Vzniklé léze, které se podobají syfilitickým, jsou výsledkem pohlavního styku s infikovaným jedincem a běžně se vyskytují na genitáliích. Na rozdíl od syfilitických vředů, léze jsou bolestivé a jsou spojeny s otoky lymfatických uzlin v tříselné oblasti. Toto onemocnění se vyskytuje nejčastěji v rozvojových zemích, převážně v Asii, Africe a Latinské Americe. Epidemiologie choroby jsou spojena s nízkým socioekonomickým statusem, špatnou hygienou, prostitucí a zneužívání drog. (2, 3)

Jsou to gram-negativní tyčinky v řetízcích nebo drobné kokobacily, které je možno izolovat na půdy s vysokým obsahem krve, popřípadě ve žlutkovém vaku kuřecích embryí. Pro odběr je potřeba materiál z vředových lézí, popřípadě z příslušných lymfatických uzlin. Nátěr klinického materiálu se pod mikroskopem jeví jako drobné hejno ryb, které je uspořádané ve shlucích nebo ve formě krátkých řetízků. K jeho průkazu jsou nezbytné bohaté půdy, např. čokoládový agar, který obsahuje 5 - 10 % bovinního fetálního séra, ke kterému je dodán disk napuštěný vankomycinem. Optimální teplota pro kultivaci za zvýšené tenze CO₂ je 35 až 37°C. (4, 1) Diagnóza *H. ducreyi* může být určena kultivací i na Mueller-Hinton agaru, doplněného 5% ovčí krve a inkubací po dobu 96 hodin v atmosféře obohacené o CO₂.(3)

3.4.5 *Haemophilus aegyptius*

Dnes je považován za biotyp druhu *H. influenzae*, který je příčinou epidemické a endemické konjunktivitidy. Jako první kdo ho popsal, byl R. Koch a to v roce 1883 u egyptských dětí, které byly postihnuté purulentní konjunktivitidou. Následně o tři roky později v roce 1886 toto onemocnění se objevilo i u amerických dětí a obdobně bylo popsáno panem Weeksem. Proto dnes tento mikrob nese název Koch-Weeksov bacil. *H. aegyptius* je původce nejenom purulentní konjunktivitidy u dětí, ale i brazilské horečky a zánětu spojivek.(1)

3.4.6 *Haemophilus aphrophilus*

H. aphrophilus se vyskytuje jako součást běžné flóry v HCD a může zde způsobit mírné infekce respiračního traktu. Vzácně ho lze kultivovat při zvýšené tenzi CO₂ z infekčních endokarditid, pneumonií nebo mozkových abscesů.(1)

3.4.7 Ostatní hemofily

Ostatní druhy *Haemophilus*, byly zřídka prokázány jako infekce u lidí. *Haemophilus parahaemolyticus* se vyskytuje jako saprofyt, který osídluje dutinu ústní a HCD. Při oslabení obranných mechanismů na sliznici mohou výjimečně vyvolat zánět.(1)

3.5 Patogeneze a patogenita

Hemofily se přenáší kapénkovou infekcí nebo přímým kontaktem. K rozvoji závažných onemocnění však dochází až u předem infikovaných jedinců, např. při poškození sliznice virovou infekcí. Za hlavní faktor virulence se považuje přítomnost polysacharidového pouzdra u zapouzdřených druhů *H. influenzae*. Tyto druhy mohou proniknout do epitelu nosohltanu a napadnout tak přímo krevní kapiláry. Nejúčinnější pouzdra jsou u *H. influenzae* typu **b**, který obsahuje polysacharid polyribosylribitol fosfát. Tento významný typ **b** je odolný vůči fagocytóze polymorfonukleárních leukocytů v nepřítomnosti specifické nekapsulární protilátky. Proto jsou druhy typu **b** nejvíce virulentní organismy, které mohou způsobit u dětí závažné onemocnění, jako jsou např. meningitidy a epiglotitidy. Neopouzdržené kmeny jsou méně invazivní, a proto jsou často označovány jako součást bakteriální mikroflóry nosohltanu u zdravých lidí.(3) Další faktorem je hemofilový polysacharid - endotoxin, který je podobný endotoxinu enterobakterií, který indukuje zánětlivou reakci. Uplatňuje se zde jako tzv. „ciliostatická substance“, která poškozuje řasinky a epitelové buňky dýchacích cest. Prudké infekce některých druhů umí uvolnit enzym proteázu, která je schopná štěpit IgA, a tak ovlivnit slizniční imunitu.(1)

3.6 Diagnostika

Každé z výše uvedených onemocnění má svou vlastní diagnostiku, která většinou spočívá v mikrobiologickém vyšetření určité tělesné tekutiny nebo jiného získaného vzorku. K průkazu hemofilů se dnes odebírá následný materiál - krev, výtěr z HCD, vykašlávaný hlen (sputum), mozkomíšní mok, punktáty z kloubů a perikardiálního vaku. Obecně lze říci, že nález u hemofilových infekcí stejně jako u jiných bakteriálních infekcí je doprovázen změnami v krevních náběrech, které se vyznačují zvýšeným počtem bílých krvinek a zvýšením CRP. Hemofily jsou známé svou citlivostí k zevním vlivům, proto je potřeba materiál odebírat do transportních půd. Odebraný materiál je nutno uchovávat při pokojové teplotě, nikoliv v chladničce, protože hemofily při teplotě 4°C rychle hynou. Rod *Haemophilus* se díky svými náročnými požadavkům na růst kultivuje na agarové půdě bez krve s přidavkem disků napuštěných růstovými faktory, kterými se hemofily rozliší podle jejich závislosti na těchto faktorech. Pro kultivaci se využívá i půda, která tyto už faktory obsahuje např. čokoládový agar.(1) Tato metoda růstových faktorů se dnes využívá jako rutinní diagnostika, pro rozlišení hlavního patogenu *H. influenzae*, avšak je časově náročná a její spolehlivost není 100%.(16) V případě falešně pozitivního výsledku se využívá v laboratoři tzv. *porfyrinový test*.

Porfyrinový test

Tento test se provádí ve zkumavkách, kdy roztok substrátu se naočkuje na média obsahující δ -aminolevulovou kyselinu. Po 4 hodinách inkubace při 37°C vykazuje médium u kmene schopných syntetizovat porfyriny v UV-světle červenou fluorescenci. V případě porfobilinogenu, ten se prokáže červenou barvou po přidání Kovácsova činidla. Jako pozitivní se prokáže *H. parainfluenzae*, který dovede syntetizovat hemin, proto nevyžaduje X faktor, oproti *H. influenzae*, který je negativní a vyžaduje oba růstové faktory.(15) (Příloha 1)

Proto se zavedl novější způsob identifikace rodu *Haemophilus* metodu MALDI-TOF. Jde o hmotnostní spektrometrii, která měří dobu letu ribozomálních proteinů uvolněných z mikroorganismů pomocí laseru. Je to metoda, která umožňuje snadnější a rychlejší diagnostiku lidských patogenů a vyznačuje se nespornou spolehlivostí a nákladovou efektivností.(16)

Test na citlivost proti antibiotikům se dnes užívá *disková difuzní metoda*, která je vhodná k testování většiny bakteriálních patogenů i těch nejnáročnějších. Je to metoda, která používá médium Mueller - Hintonův agar obohacený 5 % mechanicky defibrilované koňské krve a 20 mg/l β -NAD (MH-F agar).(17)

Diskový difuzní test

Tato metoda nám umožňuje stanovit citlivost na antibiotika u velkého počtu bakteriálních kmenů a ulehčit postup při určování léčby. Na půdu MH-F agaru se klade maximálně 6 disků s antibiotiky, které se pokládají pomocí bodlu nebo raznice na antibiotické disky ve směru hodinových ručiček. Podle citlivosti na antibiotické disky nám bakteriální kmen po 18 hodinové kultivaci v termostatu o teplotě 37°C difunduje do okolí a vytvoří tzv. *inhibiční zónu (IZ)*. Po následujících 24 hodinách se odečte průměr této zóny a srovná se s tzv. *referenční hodnotou* (údaje výrobce disků). Inhibiční zóna je rozdělena výrobcem podle velikosti růstu kolem disků, pokud je IZ větší, než udává výrobce je kmen na ATB *citlivý*, jestliže ale je zóna menší mikrob není citlivý k příslušnému ATB a je tedy *rezistentní*.(15)

3.7 Terapie

3.7.1 Antimikrobiální léčba

Základní léčebnou metodou jsou β - laktamová antibiotika. Některé druhy hemofilů jsou schopny rozkládat tyto antibiotika, díky produkci enzymu β - laktamázy, proto se dnes využívají antibiotika s inhibitory k beta-laktamasám. β - laktamová antibiotika se skládají z β - laktamového kruhu, který je enzymem β - laktamázy rozštěpen a ztrácí tak antimikrobiální efekt. Jako inhibitor přidaný do beta-laktamových antibiotik lze považovat kyselinu klavulanovou, sulbaktam a tazobaktam. (14)

Mezi β - laktamová antibiotika proti rodu *Haemophilus* zahrnujeme peniciliny, konkrétně skupinu aminopenicilinů, a cefalosporiny.

Do skupiny aminopenicilinů řadíme:

- co-amoxicilin (augmentin) – používá se jako kombinace amoxicilinu s kyselinou klavulanovou, která kovalentně váže β - laktamázu. Spolu s ampicilinem se užívá u infekcí HCD i DCD, u sepsí a zánětu středního ucha.
- ampicilin – z důvodu jeho špatného vstřebávání se už dnes tak často nevyužívá, používá se jako první varianta léčby u těžkých homofilových sepsí a epiglottitid. Pokud však jejich účinnost je slabá využívá se v kombinaci s chloramfenikolem, který slouží jako druhá volba ATB při této sepsi.

Do skupiny cefalosporinů řadíme:

- cefuroxim – patří do podskupiny cefalosporinů II. generace, které jsou účinné na gram-negativní tyčky, mezi které řadíme i *H. influenzae*. K perorálnímu užití se podává cefuroxim *Antil* (Zinnat) nebo je v injekční formě jako cefuroxim (Zinacef). Je účinný proti druhům, které produkují beta-laktamasu.(14)

Jako další antibiotika, která se užívají k obraně proti gram-negativním bakteriím, jsou makrolidy spolu s amfenikoly:

- makrolidy – mají bakteriostatický účinek, váží se na rRNA, tlumí proteosyntézu a brání vzniku tRNA. Jako makrolid I. generace se používá *Erythromycin*.
- amfenikoly – ATB této skupiny je chloramfenikol, působí jak na aerobní tak i na anaerobní gram-negativní bakterie a působí jako inhibitor proteosyntézy u řady druhů. Jeho účinek je bakteriostatický a dnes se užívá pouze jako doplňkové antibiotikum. Podává se k léčbě těžkých homofilových sepsí, zvláště u infekcí způsobených *H influenzae*, např. u meningitidy.(14)

3.7.2 Prevence

Vzniku ohnisek závažných infekcí lze předcházet v dnešní době očkováním. Očkovací látka Hib, kapsulární polysacharid typu **b** neboli PRP je bílkovinná složka ribozomů izolovaných z *H. influenzae*, která se podává v několika dávkách jako součást tzv. hexavakcíny. První pokusy očkování této vakcíny byly nezdařilé a to z důvodu, že tento polysacharid ve své čisté podobě není imunogenní u dětí, u skupiny nejvíce ohrožené infekcí. Později se však prokázalo, že vakcína PRP konjugovaná proteinem, např. difterickým toxoidem slouží jako dobrá protilátková odpověď u kojenců. U dospělých v důsledku častého a časného podávání antibiotik v dětství dochází k potlačení tvorby „baktericidních“ protilátek, které jsou přítomny v séru a spolupracují s komplementem k usmrcení hemofilů. Následkem potlačení tvorby těchto protilátek dochází k zesílení vnímavosti dospělé populace k hemofilovým infekcím.(3, 4)

4. Závěr teoretické části

V teoretické části své bakalářské práce jsem se zabývala obecnými poznatky o rodu *Haemophilus*, který se dnes považuje za původce závažných infekcí ovlivňující život člověka. Rozvoj těchto závažných onemocnění dochází především u infikovaných jedinců např. virovým onemocněním, a jsou přenášeny kapénkovou infekcí.(3) Dále jsem se v teoretické části práce zabývala jednotlivými druhy rodu *Haemophilus* a stručně jsem uvedla jejich klinický význam. Cílem mého zkoumání bude nejdůležitější druh, a sice *H. influenzae*, který se stal nejvíce virulentním druhem tohoto rodu. Tento druh způsobuje závažné onemocnění u dětí např. zánět středního ucha a u dospělých např. chronickou obstrukční plicní nemoc.(7) Ohniskem závažných infekcí se stal především *H. influenzae* serotyp **b**, který obsahuje polysacharidové pouzdro obsahující polyribosilribitol fosfát, který je odolný vůči fagocytóze polymorfonukleárních leukocytů v nepřítomnosti specifických protilátek organismu. Proto byla zavedena očkovací hexavakcína (Hib) proti tomuto typu hemofilu, která obsahuje protilátky proti polysacharidovému pouzdru hemofila typu **b**.(3) Kromě očkovací vakcíny se používá

jako základní léčebná metoda i antibiotikum. Nejpoužívanější antibiotikum je z řady aminopenicilinů - co-amoxicilin a z řady amfenikolů - chloramfenikol.(14)

V prostředním oddílu teoretické části se zabývám i zpracováním a identifikací hlavního patogenu pomocí rutinního testu s růstovými faktory a metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, jejichž porovnání je cílem mého výzkumu.

5. Praktická část

Výzkum na téma rod *Haemophilus* a jeho laboratorní vyšetření v současné medicíně jsem si vybrala, protože bych chtěla prozkoumat spolehlivost a náročnost zpracování materiálu novějšími metodami a porovnála je s běžnými rutinními postupy. Tento výzkum jsem si zvolila, abych prokázala, že novější metoda MALDI-TOF MS je rychlou revoluční metodou umožňující snadnější a spolehlivější diagnostiku lidských patogenu než konvenční identifikační metoda růstovými faktory.

5.1 Stanovení cíle výzkumu

Cílem této práce je izolace rodu *Haemophilus* z horních cest dýchacích prostřednictvím mikrobiologických vyšetřovacích postupů. Dále identifikace nejhlavnějšího potencionálního patogenu, tj. *H. influenzae* a porovnání jednotlivých rutinních a standardizovaných metod při jeho určování. Tato identifikace byla provedena za odborné asistence mého vedoucího bakalářské práce v laboratoři Synlabu czech, s.r.o., v Českých Budějovicích. Pro znázornění četnosti výskytu *H. influenzae* v jednotlivých ročních obdobích za rok 2013 jsem nasbírala výsledky z laboratorního informačního systému Synlabu ze spádové oblasti Jižních Čech a zpracovala je do statistických údajů.

Cíle by se tedy daly shrnout do několika základních bodů:

1. izolace rodu *Haemophilus* z horních cest dýchacích
2. identifikace druhu *H. influenzae*
3. porovnání jednotlivých metod při určování *H.influenzae*
4. znázornit četnost výskytu *H. influenzae* v ročních obdobích za rok 2013

5.2 Definice hypotéz

Hypotéza 1.:

Četnost výskytu *H. influenzae* v roce 2013 závisí na ročním období.

Hypotéza 2.:

Metoda MALDI-TOF MS je spolehlivou a rychlou metodou pro identifikaci rodu *Haemophilus*, na rozdíl od rutinního diagnostického testu s růstovými faktory.

6. Metodika výzkumu

6.1 Kvantitativní výzkum

Cílem tohoto výzkumu bylo zjistit četnost výskytu bakterie *H. influenzae* v závislosti na ročním období a srovnání jednotlivých metod použitým při jeho identifikaci.

6.2 Charakteristika sběru dat

Data pro vytvoření své bakalářské práce jsem získala v mikrobiologické laboratoře Synlab czech, s.r.o., v Českých Budějovicích pod odborným dohledem mého vedoucího práce a mikrobiologických pracovníků. Materiál, který byl použit pro identifikaci, pocházel z terénních ordinací od praktických lékařů z Jižních Čech, které běžně byly dopraveny do laboratoře Synlabu. Pro identifikaci a srovnání jednotlivých metod jsem použila padesát vzorků z horních cest dýchacích, které jsem sama zpracovala a posléze za odborné asistence mého vedoucího vyhodnotila. Porovnála jsem výsledky dvou vyšetřovacích metod, jejich spolehlivost a náročnost v průběhu zpracování. Metody, které byly použity pro získání výsledků, jsou popsány níže.

Dále jsem sbírala výsledky četnosti výskytu *H. influenzae* za rok 2013 z laboratorního informačního systému Synlabu a porovnála tak jednotlivá roční období. Cílem mé práce bylo i osvojit si praktické znalosti správné laboratorní praxe, při zpracování materiálu a při určování citlivosti na antibiotika u izolovaného druhu *H. influenzae*.

6.2.1 Použité metody a postupy

Hlavní metody, které jsem použila ke srovnání při identifikaci *H. influenzae* byly test s růstovými faktory jako rutinní diagnostická metoda a metodu hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF.

6.2.2 Odběr vzorku, transport a skladování organismu

K průkazu rodu *Haemophilus* se odebírání:

- Výtěr z nosohltanu
- Hnis
- Likvor
- Vykašlaný hlen (sputum)
- Mozkomíšní mok
- Krev pro hemokultivaci
- Punkáty z kloubů a perikardiálního vaku

Materiál po dodání do laboratoře je potřeba zpracovat co nejrychleji, protože hemofily jsou citlivé na zevní podmínky, k jejich odběru se tedy používají transportní půdy. Jako jedna z transportních půd se používá Amiesovo transportní médium, které je specifické svou polotuhou konzistencí a hodí se k transportu i těch nejnáročnějších bakterií. Hemofily jsou obecně náchylné na teplotní výkyvy, a proto se musí skladovat při teplotě vyšší jak 4°C. Při růstu na kultivačních půdách hemofily vyžadují teplotu 35 až 37°C, a protože většina z nich je fakultativně anaerobní, vyhovuje jim atmosféra obohacená CO₂.(1, 13)

Amiesovo transportní médium

Úkolem transportního média je udržet životaschopnost mikroorganismu během transportu do laboratoře a stejný poměr jejich výskytu jako v místě odběru. K transportu se využívají půdy, které mají specifickou polotuhou konzistenci, udržují dostatečnou vlhkost a mohou obsahovat nepatrné množství černého uhlí.(18)

Amiesovo transportní médium:

- s aktivním uhlím – je doporučeno pro výtěry z krku, vaginy a rány, nejčastěji se používá pro záchyt choulolistivých anaerobů např. *Neisseria gonorrhoeae*, přítomností aktivního uhlí dochází k neutralizaci toxických produktů látkové výměny, které vznikají růstem mikroorganismů.(19)
- bez aktivního uhlí – obdobně jako médium s aktivním uhlím se využívá u výtěru s krku, vaginy, ran a slouží také k záchytu nejchoulolistivějších mikrobů,

nicméně nepřítomností aktivního uhlí usnadňuje barvení dle Grama a přímé testování antigenů.(19)

Odebraný materiál v Amiesově médiu přežívá při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Amiesovo médium obsahuje anorganické soli, thioglykolát sodný, 1 % agaru a ve většině případů i výše zmíněné aktivní uhlí. (15)

6.3 Kultivace

Kultivace je úspěšná pouze v případě čerstvého materiálu, nikoliv ze vzorku, který byl uložený přes noc v chladničce.

6.3.1 Krevní agar (KA)

Hemofily díky svým nárokům na růstové faktory nerostou osamoceně na krevním agaru (KA), nicméně se ukázalo, že je spolehlivou půdou pro kultivaci vzorků z horních a dolních cest dýchacích. KA se stal základní půdou pro kultivaci většiny mikrobů nejenom hemofilů, ale aby hemofily mohly růst na KA je nutno využít tzv. „satelitového fenoménu“. Je to schopnost hemofilu růst v přítomnosti čáry *Staphylococca aureae*, který produkuje hemolysin lyzující erythrocyty bezprostředně v blízkosti čáry stafylokoka a uvolní tak dostatečné množství faktoru X a V. Hemofily rostou v jeho blízkosti ve formě bezbarvých lesklých kolonií a vytváří tak satelitismus. Na KA jsou dále umístěny disky, které slouží k potlačení běžné mikroflóry a k záchytu patogenu. Pro potlačení růstu rodu *Haemophilus* se klade disk napuštěných bacitracinem, což je antibiotikum rezistentní k hemofilům, a disky vankomycin a kolistin pro případný růst patogenních Neisserií.(1, 2, 15)

Dnes se v laboratoři využívá KA obohacený 5-10 % ovčí krve, jiným názve Columbia, který se v současnosti považuje spíše za diagnostickou půdu díky své schopnosti vytvořit hemolýzu u některých mikrobů. Růst většiny mikrobů je podmíněn přítomností živin, které dodávají speciální směs pepton. Inkubace vyšetřovaných bakterií je nutná po dobu 18-72 hodin při teplotě 37°C v mikroaerofilní nebo aerobní atmosféře, v závislosti na typu vyšetřovaných bakterií.(20)

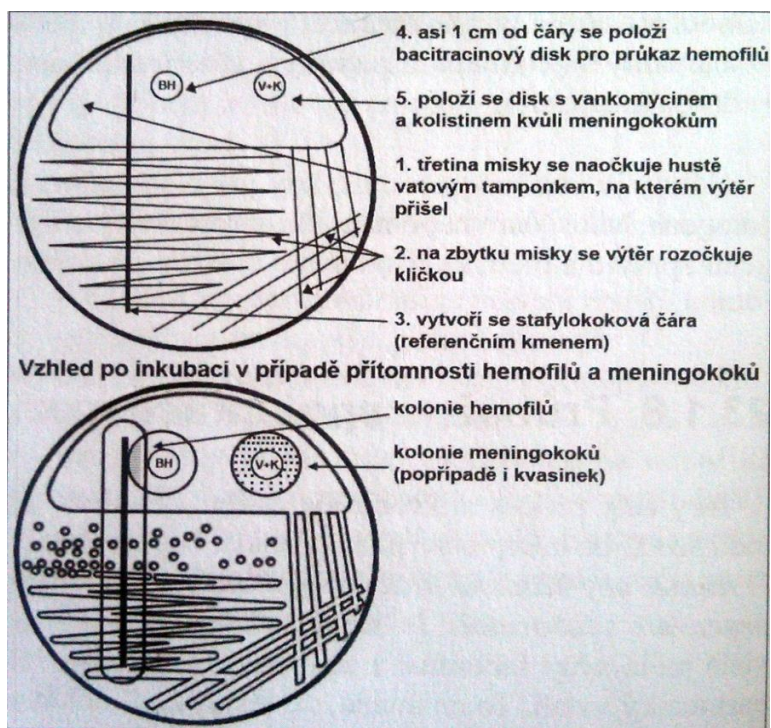
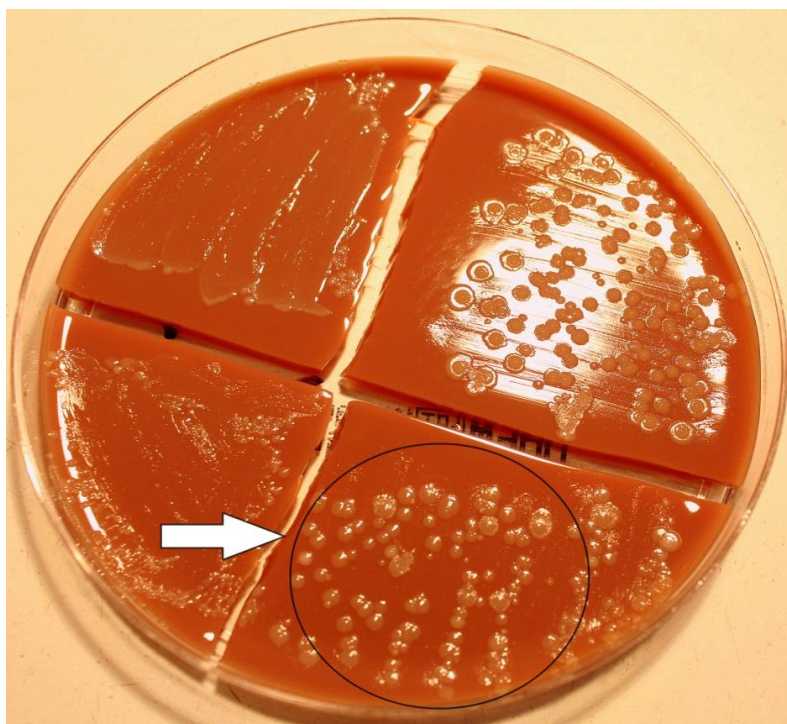


Schéma 1 Očkování výtěru z krku (15)

6.3.2 Čokoládový agar (ČA)

Další půda, která slouží k izolaci rodu *Haemophilus* je čokoládový agar (ČA). Je to pevná obohacená kultivační půda, která vzniká při zahřátí krevního agaru na 80°C. KA díky zahřátí na tak vysokou teplotu inaktivuje enzym NAD-asu a uvolní z rozpadlých erytrocytů hemin. ČA je bohatá půda na oba růstové faktory a proto umožňuje růst většiny hemofilů. Hemofily zde rostou ve formě vodnatých a našedlých kolonií o průměru až 3 mm.(15)



Obrázek 2 Čokoládový agar s rodem *Haemophilus* (vlastní zdroj)

K určení druhu *Haemophilus* z klinických vzorků se smíšenou mikroflórou, zejména s respiračního traktu se využívá čokoládový agar s bacitracinem (ČOKB). Růst testovaných bakterií je podporován živinami přítomnými v médiu, které jsou vhodné k optimálnímu růstu i náročných bakterií. ATB bacitracinu působí selektivně a potlačuje tak růst nejen gram-negativních mikrobů, ale i většiny nepatogenních Neisserií. Inkubace ČOKB je po dobu 18 - 24 hodin při teplotě 37°C v atmosféře obohacené o CO₂. (21)

Postup očkování na základní ČA

Potřebný materiál: sterilní vatové tampóny, bakteriologické kličky pro opakované použití, jednorázové rukavice, sterilní pinzeta, plynový kahan, čokoládový agar, lihový popisovač, termostat, sterilní folii se substrátem obsahující CO_2 , disk bacitracinu,

a) Před manipulací se vzorky si nejprve připravíme půdu ČA, kterou vytáhneme z komorové lednice a ponecháme ji po dobu 30 minut při laboratorní teplotě;

b) připravenou plotnu si označíme pomocí lihového popisovače podle čísla vzorku, který budeme následně rozočkovávat;

c) Materiál pomocí tampónu nebo bakteriologické kličky, kterou je nutné předem vyžít pod plamenem kahanu, kvůli případné kontaminaci, inokulujeme do okraje Petriho misky v podobě čáry nebo vytvoříme inokulum krouživým či rovnoběžným pohybem;

d) Poté vyžítanou bakteriologickou kličkou průběžně rozočkuje materiál třemi až pěti rovnoběžnými čarami;

e) Výměnou kličky za nově vyžítanou dále postupujeme opakovaně od nově vzniklých čar do úplného zaplnění plotny;

f) Po několika sterilizováních kličky je vzorek značně naředěn a na konci čar zůstávají pouze jednotlivé bakterie, tvořící samostatné kolonie, které jsou zdrojem pozorování;

g) Do místa vytvořeného inokula se umístí sterilní pinzetou disk s bacitracinem, který umožní lepší růst hemofilů;

g) Po naočkování celé plotny a umístění disku s bacitracinem je ČA vložen do termostatu ve sterilní folii, ve které je substrát obsahující CO_2 , aby se vytvořila optimální atmosféra pro růst, a inkubuje se při stálé teplotě 37°C po dobu 24 hodin, v případě potřeby 48 hodin;

h) Po 24 - 48 hodinách podle nárůstu a vzhledu kolonií hodnotí odborným lékařem, o jaký kmen se jedná a po vyhodnocení lékař se určí citlivosti na ATB.

6.4 Test s růstovými faktory

Jak už bylo zmíněno výše rod *Haemophilus* je náročný na svoji kultivaci a pro rozlišení jednotlivých druhů, zejména *H. influenzae*, potřebuje ke svému růstu růstové faktory. Růstové faktory jsou komerčně vyráběné diagnostické disky X, V a X+V faktory, které slouží k jednoduché rutinní diferenciaci druhů rodu *Haemophilus* z klinického materiálu. Tento test využívá rozdílných nároků jednotlivých druhů hemofilů na růstové faktory X, V a vyšetřovaný druh po příslušné době inkubace vykazuje růst v okolí disků obsahující požadované faktory. Pro kultivaci suspenze zkoumaného druhu je využíván Mueller – Hintonův (MH) agar, který je doporučován jako základní médium pro izolaci rodu *Haemophilus* a *Neisseria*. MH agar je používán pro všechny druhy vzorků z infekcí, u kterých je podezření na přítomnost náročných bakterií. (2, 15)

Jeho hlavní využití spočívá tedy v neselektivní izolaci druhů *Haemophilus* a ostatních bakterií, které nemohou růst na běžně dostupných agarových půdách, jako je např. Columbia KA s 5% ovčí krve.(22)

Test se využívá hlavně pro rozlišení druhů *H. influenzae* a *H. parainfluenzae*. Tak jako i jiné testy je tento test zatížen chybou. Test růstových faktorů může způsobit falešně pozitivní výsledek např. u *H. parainfluenzae*, a to při odběru čerstvé kultury z ČA. Při odběru je možné vzít i část tohoto agaru, který obsahuje tyto faktory a ovlivnit tak hodnocení výsledku. Pro vyvarování se chybného určení hemofilů se užívá tzv. porfyrinový test, který odhaluje bakterie schopné syntetizovat porfyriny a porfobilinogen přeměnou kyseliny δ- aminolevulovou.(15)

6.4.1 Postup umístění růstových disků na MH agar

Potřebný materiál: bakteriologická klička pro opakované použití, jednorázové rukavice, sterilní pinzeta nebo jehla, plynový kahan, Petriho misky s agarovou půdou bez příměsí krve (MH agar), diagnostické disky X, V a X+V, termostat a zvýšená atmosféra CO₂,

a) Před manipulací se vzorky si nejprve připravíme půdu MH agaru, kterou vytáhneme z komorové lednice a ponecháme ji po dobu 30 minut při laboratorní teplotě, spolu s růstovými faktory, které se uchovávají v temnu při teplotě – 18°C;

b) Připravenou plotnu si označíme pomocí lihového popisovače podle čísla kultury, ze které budeme následně rozočkovávat;

c) Čerstvou 24 hodinovou kulturu testovaného druhu bakteriologickou kličkou rovnoměrně naočkujeme na agarovou půdu a po naočkování se přiloží sterilní pinzetou nebo jehlou diagnostické disky s růstovými faktory;

d) Vzdálenost růstových faktorů by měla být min. 2cm od sebe, vkládáme faktory X, V a X+V;

e) Naočkované kultury na MH agaru se vloží do termostatu, který má teplotu 37°C a inkubuje se v atmosféře za zvýšené tenze CO₂ po dobu 18-24 hodin, popřípadě podle potřeby 48 hodin.

d) Po inkubaci hodnotí odborný lékař kolonie narostlé v okolí disků a podle nich určí, o jaký typ druhu se jedná.



Obrázek 3 MH agar s růstovými disky aplikované na polovině média (vlastní zdroj)

Tabulka 1 Požadavky různých druhů hemofilů na růstové faktory (15)

POŽADAVKY RŮZNÝCH DRUHŮ HEMOFILŮ NA RŮSTOVÉ FAKTORY			
Druh	factor X	factor V	Porfyrinový test
<i>H. influenzae</i>	+	+	-
<i>H. aegyptius</i>	+	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>H. Paraphrophilus</i>	-	+	+
<i>H. segnis</i>	-	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	+/-	-	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-

Legenda: Faktor X – hemin, faktor V- NAD, pozitivní (+), negativní (-)

6.5 MALDI – TOF

MALDI – TOF je hmotnostní spektrometrie (MS), fyzikálně – chemická metoda, která je založená na rozdělení nabitých částic, určující molekulovou hmotnost atomů a molekul v elektrickém/magnetickém poli. Dříve se způsoby ionizace a detekce umožňovaly identifikovat látky pouze s nízkou molekulovou hmotností. Dnes pokrokem technologie je možno ke stanovení vyšších molekulových hmotností využít *ionizaci laserem za přítomnosti matrice* (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem pro dobu letu (TOF, time – of - flight). Detektor měří dobu průletu částice uvolněné ze vzorku a vypočítá z ní tak její rychlost. Tato doba letu se pak pomocí kalibračních konstant přepočítá na hmotnost jednotlivé molekuly.(23)

Až do nedávné doby, mikrobiální identifikace v klinických diagnostických laboratořích se spoléhala pouze na konvenční identifikační metody (př. kultivace na kultivačních půdách). Vývojem zařízení MALDI – TOF MS umožnilo snadnější a rychlejší diagnostiku lidských patogenů a potenciálně nahradit a / nebo doplnit běžné identifikační techniky.(24)

V laboratoři Synlab czech, s.r.o., se využívá hmotnostní spektrometr řady microflex LT MALDI – TOF firmy Bruker Daltonics s iontovým zdrojem microSCOUT a analyzátořem doby letu TOF ve spojení se softwarovým systémem MALDI Biotyper.

Série microflex LT - standardní stolní MALDI – TOF systéř, který byl navržen k mohutné a snadno realizovatelné aplikaci.(25)

6.5.1 MALDI Biotyper

Je systéř identifikující mikroorganismy pomocí MALDI - TOF MS, který umožňuje přesné identifikace na úrovni druhu většiny gram-pozitivních i gram-negativních bakteriálních druhů s výjimkou několika složitých druhů, které vyžadují větší pozornost a další rozvoj metody. Dále se využívá pro identifikaci kvasinek a mnohobuněčných hub.(26) Tento systéř splňuje všechny požadavky pro nový revoluční přístup k identifikaci mikroorganismů, nabízí snadnou přípravu vzorků, rychlost jejich zpracování, robustnost, vysoký výkon, snadné ovládání, nízkou nákladovost a efektivnost, mimo jiné je založen na pokročilé a velmi uznávané technologii: hmotnostní spektrometrie.(27)

Provedením analýzy se získá proteinový profil daného izolátu specifického jako otisk prstu (fingerprint). MALDI Biotyper využívá velmi bohaté bílkoviny, které se nachází ve všech mikroorganismech a charakteristický vzor těchto bílkovin je pak použit pro spolehlivou a přesnou identifikaci konkrétních mikrobů. Tento vzor je pak srovnán s referenční (komerční) databází kontrolních druhů k určení totožnosti mikroorganismů na úrovni poddruhů. Vysoce automatizované pracovní postupy umožňují pracovníkům získat a analyzovat informace z nejmenšího množství vzorků – během několika sekund.(28)

Obecné podmínky pro přípravu vzorků pro MALDI Biotyper:

Kultivace mikroorganismů

- pro kultivaci se využívá kultivační médium Columbia krevní agar s 5 % ovčí krve za běžných kultivačních podmínek;
- nejlepších výsledků dosáhneme použitím stejných podmínek (teplota 10-30°C, vlhkost 15 – 85 %, růstové stavy, klimatizovaná místnost);
- pokud možno měl by být použit čerstvý materiál (po 24 hodinách) nebo v případě pomalu rostoucích bakterií, několikadenní kultury;
- díky možnému vysokému riziku přítomnosti dvou rozdílných druhů při odběru primárních agarových půd, doporučuje se tedy izolační kontrola přes noc;
- kultivační půdy by měly být uloženy při laboratorní teplotě, protože pokud by byly uloženy běžně jako ostatní kultivační půdy při teplotě 4°C mohla by být kvalita spekter poměrně nekvalitní;
- základním požadavkem je používat při postupu špičky značky Eppendorf, z důvodu uvolnění změkčovadel, které by mohly zkontaminovat spektra;
- je nutno používat chemikálie nejvyšší kvality, které jsou součástí MALDI Biotyper tzv. Starter Kit. (29)

Příprava roztoku MALDI matrice

- nejprve je nutno si připravit zásobní roztok, který by měl obsahovat: 50% acetonitril (AN), 47,5 % destilované vody a 2,5% trifluoroctové kyseliny (TFA);
- pro přípravu 1 ml matrice je potřeba napipetovat do Eppendorfky 500 µl 100% AN, 475 µl destilované vody a 25 µl 100% TFA, pak důkladně promíchat;
- připravený roztok matrice lze uchovávat při laboratorní teplotě v temnu po dobu až dvou týdnů.(29)

6.5.2 Postup přípravy vzorku k analýze

Analýza vzorků bude provedena z přístroje řady microflex typ MALDI od společnosti Bruker, s.r.o. a počítačového systému MALDI Biotyper.

Potřebný materiál: čerstvé kultivační půdy s testovanými druhy, kovovou MALDI destičku, dřevěné párátko nebo sterilní kličku pro nanesení kolonie, MALDI matrici, špičky značky Eppendorf, mikropipetu, záznamový arch a jednorázové rukavice.

- a) Jako první si vypíšeme záznamový arch s čísly testovaných druhů na kultivačních mediích;
- b) vzorek (tj. kolonie mikroorganismu) se přenese dřevěným párátkem nebo sterilní kličkou na určitou pozici nosiče – terčík MALDI target, pozici na nosiči jsou označeny ve vodorovné části číslicemi a ve svislé části písmenka abecedy (příloha 2);
- c) ke vzorku naneseného na nosiči se přidá mikropipetou 1 μ l MALDI matrice, špičky je potřeba měnit při každé aplikaci na jednotlivé vzorky, aby se předešlo případné kontaminaci;
- d) MALDI matrici necháme na destičce zaschnout, bakterie, které jsme nanесли, degradují pomocí matrice na jednotlivé molekuly;
- e) po zaschnutí destičky a před jejím vložením do přístroje je potřeba nastavit přístroj pro analýzu, ta zahrnuje přípravu vakua a kontrolu systému podle kontrolky, které jsou zobrazeny v počítačovém softwaru MALDI Biotyper;
- f) po kontrolní analýze vložíme destičku do přístroje a spustíme měření, přístroj obsahuje mimo jiné i kameru, která snímá detekované pole a obrazově destičku;
- g) počítačový systém nám umožní zadat vzorky podle čísel, které jsme uvedli do záznamového archu do příslušných poloh, pro každou polohu (terčík) přísluší jedno číslo vzorku;
- h) v průběhu měření se nám na obrazovce zobrazí křivky, které se navzájem porovnávají a hledají společné parametry, křivky jsou barevně rozlišeny, červená křivka značí známé parametry z databáze systému a modrá, která značí náš testovaný vzorek (příloha 3);

- i) proces vyhledávání trvá několik minut, následně nám přístroj vyhodnotí vyšetřovaný vzorek a poskytne nám výsledek (příloha 4);
- j) po měření vzorků je vypuštěno vakuum a destička je vytažena z přístroje, pro možné další měření vzorku je nutno vakuum opět doplnit.

7. Výsledky

7.1 Kvantitativní výzkum

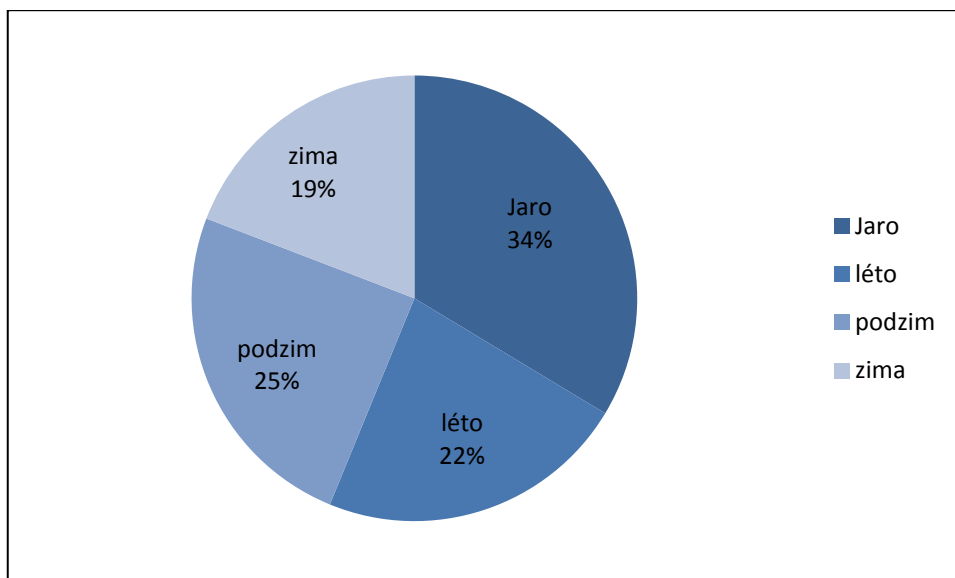
7.1.1 Četnost výskytu *H. influenzae* za rok 2013

Za rok 2013 bylo v mikrobiologické laboratoři Synlab, czech s.r.o. v Českých Budějovicích celkem 4246 pozitivních testů na bakterii *H. influenzae*. (Tabulka 4) Z tohoto počtu je největší počet pozitivních testů v měsíci duben a květen, které jsou znázorněny v grafu 2. Duben dosáhl počtu 510 pozitivních testů, tudíž bylo infikováno 12 % lidí, za to v měsíci květen tento počet mírně přesáhl a vyšplhal se až k 528 pozitivních testů. V procentuálním zastoupení bylo v měsíci květen infikováno 12,4 % osob, bez ohledu na věk nebo pohlaví. Nejnižší incidence infikovaných bylo v měsíci leden a to počtem 169 pozitivních testů, kdy bylo nakaženo pouze 3,4% lidí.(Graf 3) Dále podle rozdělení na roční období se ukázalo, že na Jaro je nejvyšší incidence nakažených za celý rok, a to 34 % z celkového počtu infikovaných. (Tabulka 3)

Tabulka 3 Přehled počtu infikovaných z *H. influenzae* v jednotlivých ročních obdobích za rok 2013

Měsíc	Počet	Procent (%)
Jaro	1428	34
léto	958	22
podzim	1046	25
zima	814	19
Celkem	4246	100

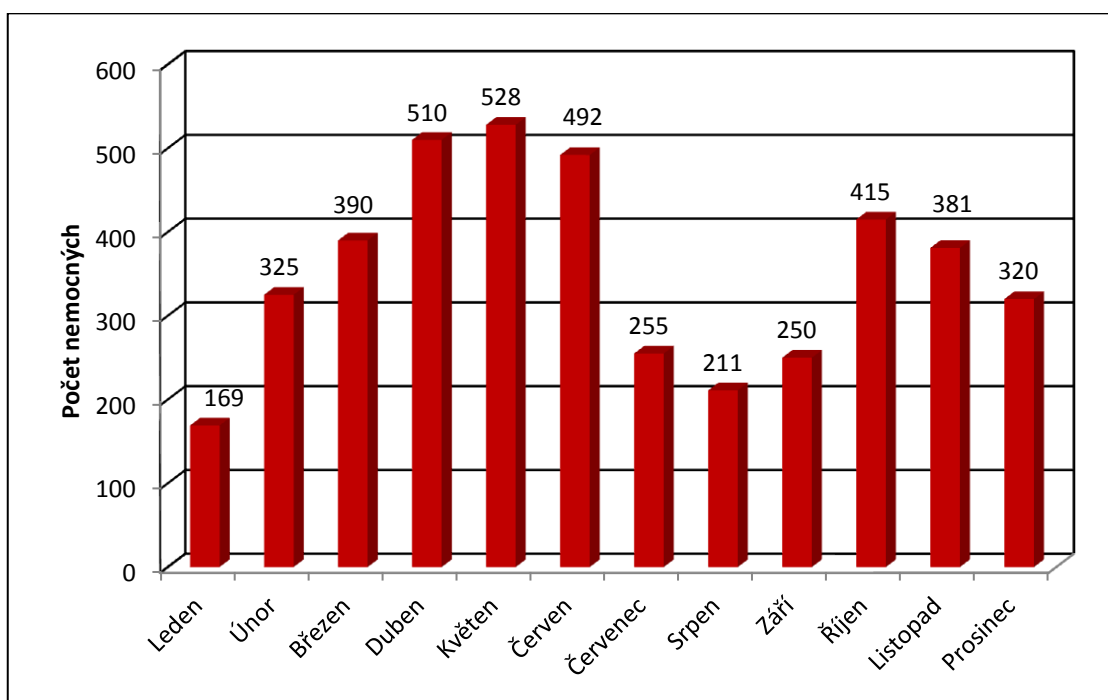
Graf 1 Procentuální výskyt *H. influenzae* v jednotlivých ročních obdobích za rok 2013



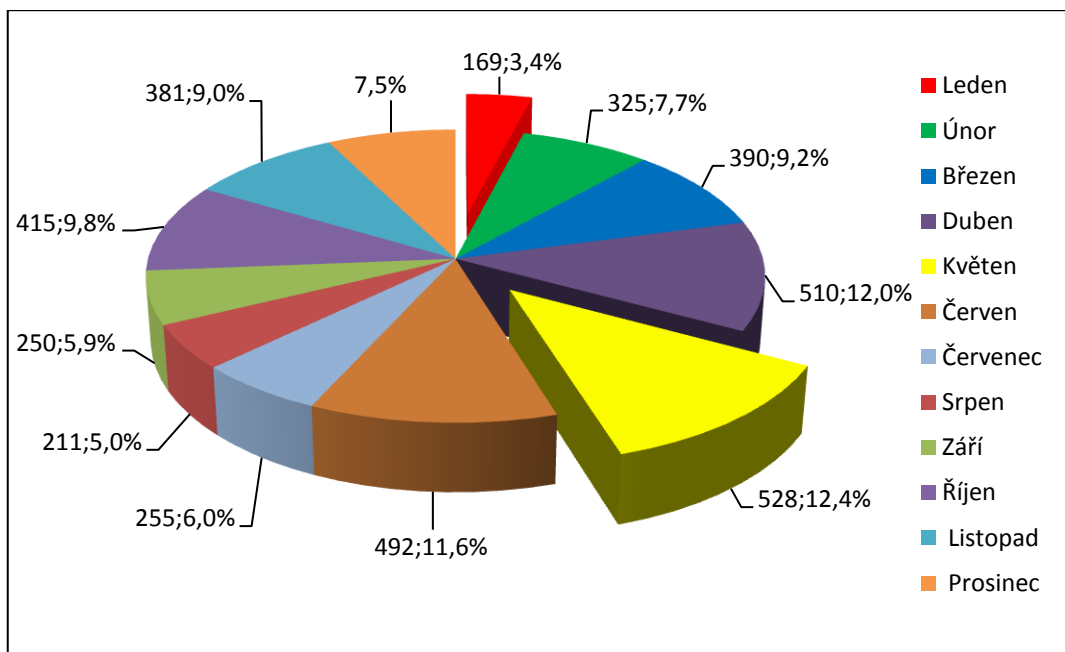
Tabulka 4 Přehled výsledků a procentuální zastoupení v jednotlivých měsících za rok 2013

Měsíc	Počet pozitivních testů	procento (%)
Leden	169	4,0
Únor	325	7,7
Březen	390	9,2
Duben	510	12,0
Květen	528	12,4
Červen	492	11,6
Červenec	255	6,0
Srpen	211	5,0
Září	250	5,9
Říjen	415	9,8
Listopad	381	9,0
Prosinec	320	7,5
Celkem výskyt <i>H. influenzae</i>	4246	100

Graf 2 Názorné zobrazení četnosti výskytu *H. influenzae* za rok 2013



Graf 3 Procentuální zobrazení četnosti výskytu *H. influenzae* v jednotlivých měsících za rok 2013



7.1.2 Výsledky jednotlivých metod

K porovnání jednotlivých metod bylo použito dohromady 50 vzorků z výtěru horních cest dýchacích, které pocházely z terénních ordinací od praktických lékařů ve spádové oblasti Jižních Čech. Vzorky byly vybrány nezávisle na věku či pohlaví. Zpracování a vyhodnocení vzorků jsem hodnotila ve spolupráci se svým vedoucím.

Test na růstové faktory vyhodnotil, že z 50 možných vzorků bylo 31 pozitivních na *H. parainfluenzae*, který roste kolem disku s faktorem V a 19 vzorků pozitivních na *H. influenzae*, který se vyskytoval v oblasti kolem disku s faktorem X+V. (Tabulka 5)

K vyhodnocení a porovnání metody MALDI - TOF s testem na růstové faktory byla použita stejná půda, na které se provedl odečet růstových faktorů, tudíž MH agar. Přístroj po zpracování vzorků MALDI - TOF hmotnostní spektrometrií a vyhodnocení softwarovým systémem MALDI Biotyper vyhodnotil, že z použitých 50 vzorků je 24 pozitivních na *H. parainfluenzae* a 22 pozitivních vzorků s *H. influenzae*. Zbylé 4 vzorky přístroj nevyhodnotil a označil je jako nedostatečná identifikace. Tato nedostatečná identifikace vznikla v důsledku malého množství kolonie mikroorganismů přenesených na destičku MALDI. (Tabulka 6)

Tabulka 5 Test s růstovými faktory

Mikrob	počet pozitivních vzorků
<i>H. influenzae</i>	19
<i>H. parainfluenzae</i>	31
Celkem	50

Tabulka 6 MALDI Biotyper

Mikrob	počet pozitivních vzorků
<i>H. influenzae</i>	22
<i>H. parainfluenzae</i>	24
Neurčené	4
Celkem	50

7.1.3 Srovnání použitých metod

Po vyhodnocení obou použitých metod jsem porovnávala jejich jednotlivé výsledky, a tedy z nich vyplývá, že ve 40 vzorcích se shodují a potvrzují přítomnost bakterie navzájem. Ve zbylých 10 vzorcích se neshodují v důsledku buď malého množství kolonií mikroorganismů přenesených na destičku MALDI nebo rozdílným výsledkem.

Tabulka 7 Výsledky testu s růstovými faktory a metody MALDI - TOF

Počet	číslo vzorku	X	X+V	V	Mikrob	MALDI - výsledek
1	471	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
2	470	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
3	469	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
4	468	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
5	253	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	Neurčeno
6	281	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
7	398	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
8	337	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
9	434	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
10	525	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
11	418	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
12	425	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	Neurčeno
13	468	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
14	186	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
15	187	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
16	188	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
17	219	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
18	218	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
19	217	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
20	216	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
21	12	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
22	32	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
23	101	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
24	72	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
25	223	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
26	222	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
27	221	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>

Počet	číslo vzorku	X	X+V	V	Mikrob	MALDI - výsledok
28	220	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
29	113	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
30	105	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
31	988	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	Neurčeno
32	168	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	Neurčeno
33	4	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
34	991	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
35	1	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
36	774	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
37	851	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
38	830	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
39	967	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
40	911	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
41	961	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
42	966	-	+	-	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
43	114	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
44	115	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
45	116	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
46	117	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
47	118	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
48	119	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
49	120	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
50	121	-	-	+	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>

Legenda: X – faktor, V- faktor, X+V – faktory, *H. parainfluenzae* – *Haemophilus parainfluenza*, *H. influenzae* – *Haemophilus influenzae*.

8. Diskuze

Základním cílem bakalářské práce bylo vyhodnotit výskyt nejhlavnějšího patogenu a to *H. influenzae* z rodu *Haemophilus* za rok 2013 a srovnat spolehlivost a náročnost rutinních a standardizovaných metod při jeho určování. Výsledky pro svoji práci byly zhotoveny z výsledků laboratorního informačního systému a z praktických metod prováděných v mikrobiologické laboratoři Synlab, czech s.r.o. v Českých Budějovicích. Stanovené hypotézy se mi podařilo potvrdit.

Hypotéza 1: Četnost výskytu *H. influenzae* v roce 2013 závisí na ročním období. Na konci roku 2013 bylo vyhodnoceno počet pozitivních vzorků na bakterii *H. influenzae*. Tento počet byl 4246 infikovaných lidí za celý rok. Tyto údaje jsem zpracovala statisticky a porovnála jednotlivé roční období a měsíce. (grafy 1, 3) Z porovnání výsledků ročních období vyplývá, že nejvyšší výskyt bakterie byl za rok 2013 na jaře, a to konkrétně v měsících duben a květen nezávisle na pohlaví a věku. (Graf 2) Z výsledku tedy vyplývá, že nárůst počtu infikovaných lidí bakterií *H. influenzae*, je dán podle mého názoru především změnou počasí, vlivem teploty, v důsledku nadcházejících teplých měsíců.

Jelikož hemofily jsou náchylné na teplotní výkyvy a vyžadují pro svůj růst teplotu 35 až 37°C, vyhovuje jim tudíž teplejší počasí a lépe se infekce u lidí přenáší. Hemofily hynou při teplotě 4 °C, a proto v zimních měsících je jejich výskyt minimální.(1) Dalším důvodem, může být zvýšený výskyt virového onemocnění např. chřipky, které u mladší a starších věkových skupin může způsobit závažné onemocnění. Infekce *H. influenzae* se dobře vyvíjí hlavně u imunodeficitních osob. (3)

Hypotéza 2: Metoda MALDI-TOF MS je spolehlivou a rychlou metodou pro identifikaci rodu *Haemophilus*, na rozdíl od rutinního diagnostického testu s růstovými faktory. Test s růstovými faktory je test, který potřebuje ke svému zpracování zdlouhavý proces kultivace a jeho inkubace trvá minimálně 24 hodin. Spotřeba materiálu na kultivaci je větší než u metody MALDI – TOF, a proto je

finančně nákladná. Při zpracování materiálu je nutná zručnost laboranta a to z důvodu možného vzniku falešně pozitivního výsledku například u *H. parainfluenzae*.

Při odběru čerstvé kultury z čokoládového agarů je možné vzít i část této agarové půdy, která obsahuje růstové faktory a ovlivnit tak hodnocení výsledku. Pro vyvarování se chybného určení hemofilů se využívá porfyritový test.(15)

Metoda MALDI – TOF je oproti testu s růstovými faktory nenáročná, snadnější a přesnější. MALDI - TOF díky svému rychlému způsobu zpracování vzorku, nám umožní rychlý výstup výsledku během několika minut, který jej porovná s referenční spektrem uloženým v knihovně počítačového softwaru MALDI Biotyper.(24, 28)

Po vyhodnocení obou metod jsem výsledky porovnála a dospěla k závěru, že z 50 možných vzorků se metody shodovaly ve 40 vzorcích a potvrdily přítomnost daného druhu navzájem. Ve zbylých 10 vzorcích se neshodují a to kvůli, buď malému množství kolonií mikroorganismů přenesených na destičku MALDI nebo rozdílným výsledkem obou metod.

9. Závěr

Tématem bakalářské práce je „Rod *Haemophilus* a jeho laboratorní vyšetření v současné medicíně“. Na začátku práce jsem si stanovila celkem čtyři cíle, které se mi podařilo splnit. Obecnou charakteristiku o rodě a jednotlivých nejznámějších druzích shrnuji v teoretické části. Rod *Haemophilus* je patogen ovlivňující život člověka a může způsobit vznik závažné infekce. Nejhlavnější patogenem tohoto rodu je *H. influenzae* jeho serotyp **b**, který je nejvíce virulentním organismem. Díky svému polysacharidovému pouzdru může vniknout do epitelu a napadnout tak krevní kapiláry nebo meningy a způsobit tak závažné onemocnění hlavně u dětí, například epiglottitidy. Základní léčebnou metodou proti hemofilům jsou β – laktamová antibiotika, na které jsou hemofily citlivý, především na antibiotika ze skupiny aminopenicilinů a chloramfenikol. Jako prevence vzniku závažných onemocnění hlavně u dětí se dnes využívá očkování tzv. Hib vakcíny, kdy je použita bílkovinná složka ribozomů izolovaného z *H. influenzae* typu b, která je spojena s konjugovaným proteinem. Takto vakcína je využívána jako dobrá protilátkou odpověď u kojenců. Hemofily obecně se přenáší kapénkovou infekcí nebo přímým kontaktem. K rozvoji závažného onemocnění avšak nejčastěji dochází, pokud je jedinec předem infikován, např. virovou infekcí.

V praktické části popisuji způsoby kultivace a identifikace hlavního patogenu metodami MALDI- TOF hmotnostní spektrometrii (MS) a testem na růstové faktory. V metodice jsou popsány i příslušné postupy k použitým metodám.

Výsledky identifikačních metod jsem uvedla v sedmé kapitole, kde mimo jiné uvádím i výsledky četnosti výskytu *H. influenzae* za rok 2013 v mikrobiologické laboratoři Synlab, czech s.r.o., v Českých Budějovicích. Dále jsem do sedmé kapitoly zařadila výsledky použitých diagnostických metod a porovnála jejich spolehlivost a náročnost při zpracování vzorků.

Na základě stanovených cílů byly vypracovány dvě hypotézy. Hypotéza 1 – Četnost výskytu *H. influenzae* v roce 2013 závisí na ročním období. Vyšší výskyt *H. influenzae*

v roce 2013 může být podle mého názoru ovlivněno zejména změnou počasí ročního období nebo přítomností virového onemocnění, které u oslabených jedinců může způsobit vznik závažného onemocnění způsobené právě hemofily.

Hypotéza 2 – MALDI – TOF MS je spolehlivou a rychlou metodou pro identifikaci rodu *Haemophilus*, na rozdíl od rutinního diagnostického testu s růstovými faktory. Výzkum ukázal, že vývojem nových moderních metod například přístroj MALDI – TOF od firmy Bruker Daltonics je užitečnou diagnostikou mikroorganismů. Je rychlejší, spolehlivější a výkonnější, a díky svému rychlému zpracování vzorku nám umožní získat výsledek během několika minut. Tato metoda díky své rychlé a přesné identifikaci podle referenčních spekter uložených v databázi softwaru MALDI Biotyper se stala, v porovnání s konvenčními identifikačními metodami, možným efektivním nástrojem taxonomické klasifikace a mikrobiologické studie.

Test s růstovými faktory se dnes užívá jako rutinní diagnostika mikroorganismů, avšak je velmi časově náročná a zpracování vzorků s jeho příslušnou inkubací trvá minimálně 24 hodin. Oproti metodě MALDI – TOF má složitou přípravu a veškerý potřebný materiál je drahý a těžko dostupný. Proto si myslím, že metoda MALDI – TOF je spolehlivou metodou ve všech směrech a díky své rychlé a přesné identifikaci mikroorganismu urychlí určení diagnózy a umožní tak nastolit příslušnou léčbu.

Výsledky bakalářská práce mohou sloužit pro výuku zdravotních laborantů a dále jako zajímavost pro širokou veřejnost, která se zajímá o vývoj a problematiku současnosti.

10. Seznam použitých zdrojů

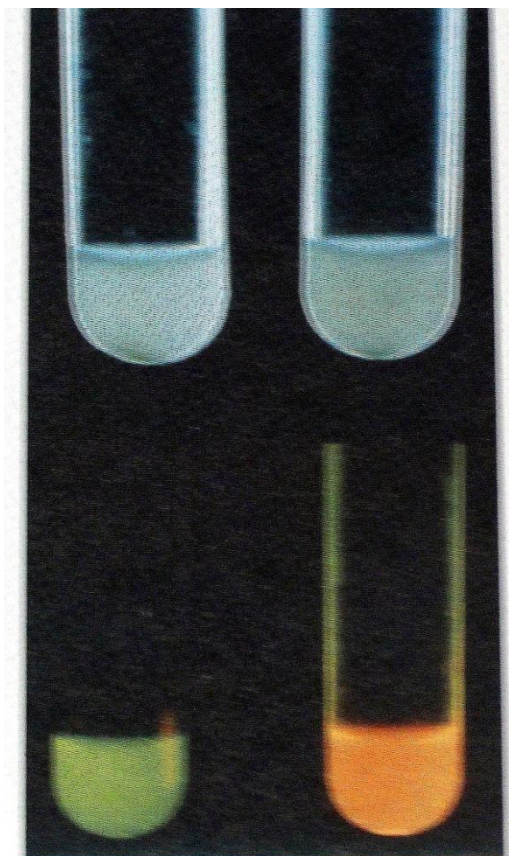
1. VOTAVA, Miroslav et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, s. 78 - 83, ISBN 80-902896-6-5.
2. VERSALOVIC, J. *Manual of clinical microbiology*. 1th ed. Washington, DC: ASM Press, 2011. s. 588 - 602. ISBN 978-1-55581-463-2.
3. MUSHER, D. M. *Haemophilus species*. Medical Microbiology. 1996, roč. 4, kap. 30. s. 1- 17.
4. BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1 vyd. Praha: Marvil, 1996, s. 560, ISBN 80-238-0297-6.
5. NORSKOV - LAURITSEN, N. *Classification, identification, and clinical significance of Haemophilus and Aggregatibacter species with host specificity for humus*. Clin Microbiol Rev. 2014, roč. 27, č. 2, s. 214 - 240.
6. SCHINDLER, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. s. 223. ISBN 978-802-4731-704.
7. DE CHIARA, M., HOOD, D., MUZZI, A., PICKARD, D. J., PERKINS, T., PIZZA, M., DOUGAN, G., RAPPUOLI, R., MOXON, E. R., SORIANI, M., DONATI, C. *Genome sequencing of disease and carriage isolates of nontypeable Haemophilus influenzae identifies discrete population structure*. Proc Natl Acad Sci USA. 2014, roč. 111, č. 4, s. 5439 - 5444.
8. DAS, I., DEGIOVANNI, J. V., GRAY, J. *Endocarditis caused by Haemophilus parainfluenzae identified by 16S ribosomal RNA sequencing*. Journal Clinical Pathology. 1997, roč. 50, č. 1, s. 72 - 74.
9. LATYSHEY, Y., MATHEW, A., JACOBSON, J. M., STURM, E. *Purulent pericarditis caused by Haemophilus parainfluenzae*. Tex Heart Inst J. 2013, roč. 40, č. 5, s. 608- 611.
10. MITCHELL, J. L., HILL, S. L. *Immune response to Haemophilus parainfluenzae in patients with chronic obstructive lung disease*. Clin Diagn Lab Immunol. 2000, roč. 7, č. 1, s. 25- 30.

11. HONG, M. J., KIM, Y. D., HAM, I. D. *Acute septic arthritis of the acromioclavicular joint caused by Haemophilus parainfluenzae: a rare causative origin.* Clin Rheumatol. 2014, 4 Mar.
12. FRICKMANN, H., PODBIELSKI, A., ESSIG, A., SCHWARZ, N. G., ZAUTNER, A. E. *Difficulties in species identification within the genus Haemophilus – A pilot study addressing a significant problem for routine diagnostics.* Eur J Microbiol Immunol. 2014, roč. 4, č. 2, s. 99- 105.
13. RYŠKOVÁ, Olga, et al. *Praktické cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie: pro studující všeobecné a zubní lékařství.* Praha: Karolinum, 2010, s. 79-80, ISBN 978-80 246-1834-0.
14. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie obecná.* Brno: Neptun, 2005, 2. Přepř. vyd., s. 351, ISBN 80-86850-00-5.
15. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody.* Brno: Neptun, 2010, s. 504, ISBN 978-80-86850-04-8.
16. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. *MALDI-TOF – mass spectrometry applications in clinical microbiology.* Future Microbiology. 2010, 5: s. 1733-1754.
17. Státní zdravotní ústav. *Disková difúzní metodologie EUCAST – příručka.* Szu [online] verze 3.0, červen 2013 [cit. 2014-06-08] Dostupné z: <http://www.szu.cz/diskova-difuzni-metoda-eucast>
18. VOTAVA, M. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*, 1.vyd., Hortus, 2000 s. 302 -307, ISBN 80-238-5058-X.
19. Med-lab trade, s.r.o., *Transportní odběrové soupravy pro mikrobiologii: s mediem.* Medlab [online]. 2008 [cit. 2014-06-09]. Dostupné z: http://www.medlab.cz/s_mediem.htm
20. BioVendor – Laboratorní medicína a.s., *Kultivační půdy: Krevní agar (Columbia).* BioVendor [online]. 2013 [cit. 2014-06-09]. Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/krevni-agar-columbiaka/p100.98025/#tab=downloads>

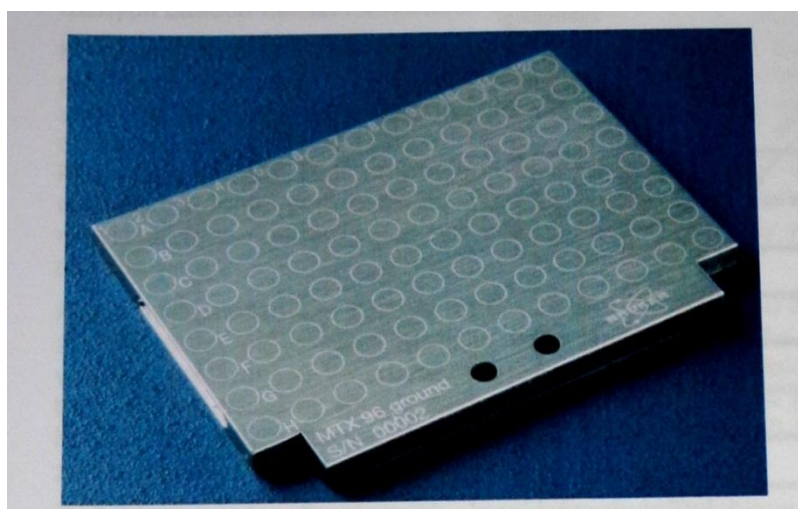
21. BioVendor – Laboratorní medicína a.s., *Kultivační půdy: Čokoládový agar s bacitracinem. BioVendor* [online]. 2013 [cit. 2014-06-09]. Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/cokoladovy-agar-s-bacitracinem-cokbac/p100.98401/#tab=downloads>
22. Erba Lachema, s.r.o. *Pracovní návody - mikrobiologie: X – faktor, V - faktor, X+V faktor. ErbaLachema* [online] 2014 [cit. 2014-06-10]. Dostupné z: https://www.erbalachema.com/attachments/X_V%20FAKTOR-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf
23. HAVLIŠ, JAN. *Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF*. Vesmír. [online] srpen 1999 [cit. 2014-06-17]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof>
24. SENG, P., ROLAIN, J. M., FOURNIER, P. E., SCOLA, L. B., DRANCOURT, M., RAOULT, D. *MALDI - TOF – mass spektrometry application in clinical microbiology*. Future Microbiol. 2010, 5 (11): 1753 – 1754.
25. Bruker s.r.o. Brochure: *microflex. Bruker-sro* [online] 2012 [cit. 2014-06-18] Dostupné z: <http://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-ms/microflex/learn-more.html>
26. CROXATTO, A., PROD'HOM, G., GREUB, G. *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiol Rev., 2012, 36 (2): 380 – 407.
27. Bruker s.r.o. MALDI Biotyper: *Systém pro mikrobiální identifikaci příští generace 21. Století. Bruker-sro* [online]. 2013 [cit. 2014-07-18]. Dostupné z: <http://www.bruker-sro.cz/maldi-biotyper>
28. Bruker s.r.o. Brochure: *MALDI Biotyper. Bruker-sro* [online]. 2011 [cit. 2014-07-18]. Dostupné z: <http://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper/learn-more.html>
29. Bruker s.r.o. MALDI Biotyper: *Návody: Obecné podmínky pro přípravu vzorku pro MALDI Biotyper*. 2011
30. Bruker s.r.o MALDI Biotyper: *Návody: Terčik*. 2011

11. Přílohy

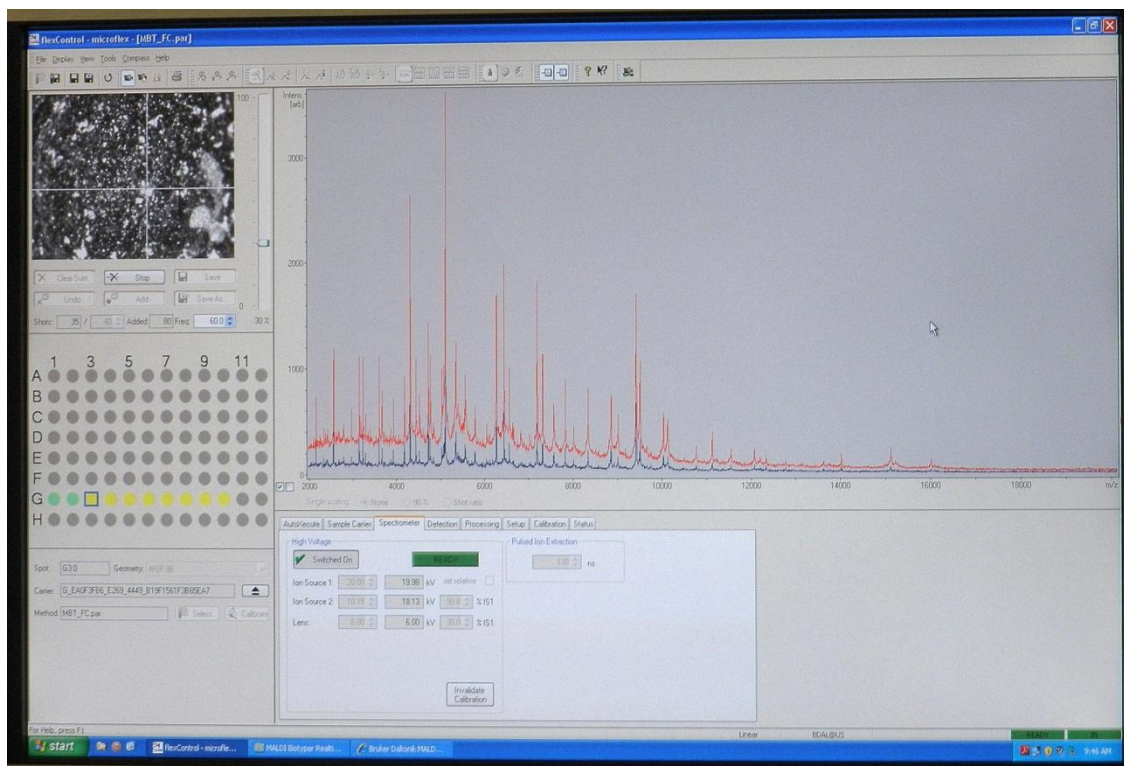
Příloha 1 Pozitivní (vrchní) a negativní (spodní) porfyrítové testy (2)



Příloha 2 Kovová destička - terčík (31)



Příloha 3 Softwarový systém MALDI Biotyper




(Vlastní zdroj)

Příloha 4 Tištěný výsledek

Bruker Daltonik MALDI Biotyper

Classification Results



Project Info

Project Name: 20140221-3
Project Description:
Project Owner: Administrator@FLEX-PC
Project Creation Date/Time: 2014-02-21T10:19:07.296Z
Project Analyte Count: 19
Project Type: Development
Validation: not present
Validation Position:

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>A1</u> (++) (A)	001	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.122</u>	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.092</u>
<u>A2</u> (++) (A)	774	Haemophilus influenzae	<u>2.085</u>	Haemophilus influenzae	<u>1.999</u>
<u>A3</u> (++) (A)	851	Haemophilus influenzae	<u>2.046</u>	Haemophilus influenzae	<u>2.025</u>
<u>A4</u> (++) (C)	830	Haemophilus influenzae	<u>2.21</u>	Haemophilus influenzae	<u>2.17</u>
<u>A5</u> (++) (A)	967	Haemophilus influenzae	<u>2.243</u>	Haemophilus influenzae	<u>2.158</u>
<u>A6</u> (++) (A)	911	Haemophilus influenzae	<u>2.29</u>	Haemophilus influenzae	<u>2.152</u>
<u>A7</u> (++) (A)	961	Haemophilus influenzae	<u>2.183</u>	Haemophilus influenzae	<u>2.119</u>
<u>A8</u> (++) (A)	966	Haemophilus influenzae	<u>2.156</u>	Haemophilus influenzae	<u>2.149</u>
<u>A9</u> (+++)(A)	114	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.313</u>	Haemophilus parainfluenzae	<u>2.3</u>

(Vlastní zdroj)