

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

**SOUČASNÁ PROBLEMATIKA *BORDETELLA PERTUSSIS* A
*BORDETELLA PARAPERTUSSIS***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

MUDr. Radim Kramář Csc.

Petra Šimánková

2011

Současná problematika *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*

Abstrakt

Bordetella parapertussis a *Bordetella pertussis* jsou původci infekcí postihující dýchací cesty. Původci jsou aerobní gramnegativní kokobacily z rodu *Bordetella* a z čeledi *Brucellaceae*. U napadených jedinců bakterií *Bordetella pertussis* se rozvine vysoce infekční onemocnění zvané Černý kašel. U nakažených *Bordetella parapertussis* jsou klinické projevy mírnější než u nakažení *Bordetella pertussis*. Z tohoto důvodu se ve světě dostává většího zájmu právě *Bordetella pertussis*. Onemocnění je vysoce infekční, postihuje dýchací cesty a patří mezi nejzávažnější infekční onemocnění dětského věku. Především během prvního roku života, před objevením očkovací látky, patřila mezi infekční nemoci s vysokou úmrtností. Nejčastěji jsou ohroženi právě kojenci. Onemocnění se začíná objevovat i nad 10 rokem života a může postihnout i dospělé, kteří bývají zdrojem infekce a nakazí své děti. Při podezření na onemocnění vyvolané kmeny *Bordetella pertussis* nebo *Bordetella parapertussis* je důležité, aby byl zaslán optimální biologický materiál, kterým je výtěr z nazofaryngu.

Cíl práce: Cílem bakalářské práce je osvojení si praktických znalostí správné laboratorní praxe, jak u bakteriálního kultivačního vyšetření výtěrů z nazofaryngu při podezření na výskyt bakterie *Bordetella parapertussis* a *Bordetella pertussis*, tak u určování citlivosti na antibiotika u izolovaných kmenů *Bordetella parapertussis* a *Bordetella pertussis* a zjistit do jaké míry se od sebe obě bakterie liší.

Dalším stanoveným cílem jsem zjišťovala a vyhodnocovala data z jindřichohradecka a ze vzorků zpracovaných mikrobiologickou laboratoří Laboma s.r.o. o četnosti výskytu bakterie *Bordetella parapertussis* a *Bordetella pertussis* v jednotlivém roce v průběhu posledních 3 let. Získané výsledky výskytu bakterie jsem zpracovala statisticky.

Dále jsem se zajímala o postupech lékařů při podezření na infekci dýchacích cest způsobenou bakterií *Bordetella pertussis*. Informace jsem získávala pomocí dotazníků.

Hypotézy : Hypotéza 1: Kultivační diagnostika *Bordetella parapertussis* bude nejen časově méně náročná než diagnostika *Bordetella pertussis*.

Hypotéza 2: Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* je vyšší v podzimních až zimních a jarních obdobích.

Hypotéza 3: Výskyt *Bordetella pertussis* a *parapertussis* je nejčastější ve věkové skupině dětí 10 - 14 let.

Sběr dat: Data pro vytvoření své bakalářské práce jsem sbírala v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. v Českých Budějovicích. Kultivačně vyšetřovaný materiál pocházel z terénních ordinací od praktických lékařů i odborných specialistů z jižních Čech. Sběr dat jsem uskutečnila v období od 1.ledna 2010 do 30.prosince 2010. Zařadila jsem do své práce statisticky zpracované informace za poslední 3 roky, které mi byly poskytnuty z databáze laboratoře Laboma s.r.o. Práce také obsahuje shrnutí výskytu *Bordetella parapertussis* a *Bordetella pertussis* z jindřichohradecka za uplynulé 3 roky. Potřebná data byla získávána a zpracovávána z dat Hygienického ústavu v Jindřichově Hradci. V poslední části jsem se zaměřila na informace od praktických lékařů pro děti a dorost a od praktických lékařů pro dospělé. Dotazníky byly vyplněny lékaři z Jindřichova Hradce a okolí.

Závěr: Z výsledků bakalářské práce lze usoudit, že kultivace *Bordetella pertussis* a *parapertussis* jsou růstově náročné bakterie. *Bordetella parapertussis* se od *Bordetella pertussis* liší nejen průběhem bakteriální kultivace, ale také vzhledem, biochemickými vlastnostmi a citlivostí na antibiotika. Hypotéza 1, 2 a 3 byly potvrzeny z výsledků provedeného výzkumu.

Current Issues Linked to *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*

Abstract

Bordetella pertussis and *Bordetella parapertussis* are causative agents of infections affecting airways. These agents are Gram-negative, aerobic coccobacillus of the genus *Bordetella* and the family *Brucellaceae*. Subjects infected with bacteria *Bordetella pertussis* develops into a highly contagious infection called whooping cough. Those infected with *Bordetella parapertussis* show milder clinical symptoms than those infected with *Bordetella pertussis*. The highly contagious infection affects the airways and is considered to be one of the most serious infections found in children. Before proper vaccine was discovered, this infection caused high mortality especially among one-year-old babies and younger. The most vulnerable group of subjects comprises of infants. Infection is even observed in subjects of 10+ years of age and may infect even the adults that are identified as the source of infection who subsequently infect their children.

In case a subject is suspected of being infected with the genus *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*, it is important to test a proper biological sample, i.e. epipharynx swab.

Objective of the thesis: The objective of the thesis is to acquire practical skills in laboratory work. This concerns bacterial culture tests of epipharynx swabs taken from subjects suspected of being infected with bacteria *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* on one hand, and assessment of sensitivity to antibiotics in case of isolated genera *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* on the other. Also, it is meant to identify to what extent the two bacteria differ from each other.

Another objective was to find out and assess the data collected in the region of Jindřichův Hradec and gathered from samples tested by Laboma s.r.o. microbiological laboratory that concerned the occurrence of the bacteria *Bordetella parapertussis* and

Bordetella pertussis in each of the past 3 years. The data gathered in relation to the occurrence of the bacterium were processed statistically.

Subsequently, medical procedures carried out in case of suspicion of airways infection caused by the bacteria *Bordetella pertussis* were scrutinized. The information was collected by questionnaires.

Hypotheses: Hypothesis 1: Culture diagnosis of *Bordetella parapertussis* will be less time demanding than diagnosis of *Bordetella pertussis*.

Hypothesis 2: The occurrence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* is higher in autumn and spring periods.

Hypothesis 3: The occurrence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* is most frequent among the children of 10-14 years of age.

Data collection: Data necessary for the thesis at hand was gathered from Laboma s.r.o. microbiological laboratory in České Budějovice. Material used in culture diagnosis was collected from field offices run by general practitioners and specialists in Southern Bohemia. Data collection was carried out between January 1, 2010 and December 30, 2010. The thesis includes statistically processed information retrieved in the past 3 years, which was provided by Laboma s.r.o. The thesis also contains a summary of the occurrence of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* in the past 3 years. All data processed for the purposes of the thesis were retrieved from the Sanitary Institute in Jindřichův Hradec. The final part focuses on information collected from general practitioners for children and adolescents and general practitioners for adults. The questionnaires were handed out to and completed by doctors living in Jindřichův Hradec and around.

Conclusion: The outcomes of this bachelor's thesis show that cultures of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* are demanding bacteria in terms of growth. *Bordetella parapertussis* differs from *Bordetella pertussis* not only in terms of the course of bacterias cultures, but also in terms of appearance, biochemical properties,

and sensitivity to antibiotics. Hypotheses 1, 2, and 3 were confirmed following the outcomes of the performed research.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma *Současná problematika Bordetelly pertussis a Bordetelly parapertussis* vypracovala samostatně a použila jen 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 BP/DP, a to v nezkrácené podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou 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 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

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Zvláštní poděkování bych chtěla věnovat MUDr. Radimu Kramáři, Csc. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu pomoci při psaní mé bakalářské práce.

Děkuji své rodině za pomoc a podporu v průběhu celého studia.

Obsah

Úvod	11
1. Současný stav	13
1.1. <i>Bordetella parapertussis</i>	14
1.1.1. Morfologické a fyziologické vlastnosti	14
1.1.2. Růstové a biochemické vlastnosti	14
1.2. <i>Bordetella pertussis</i>	14
1.2.1. Morfologické a fyziologické vlastnosti	15
1.2.2. Růstové a biochemické vlastnosti	15
1.2.3. Citlivost na zevní podmínky	15
1.3. Hlavní biologicky aktivní látky <i>Bordetella pertussis</i>	15
1.3.1. Pertusový toxin	16
1.3.2. Adenyl-cyklázový toxin	16
1.3.3. Dermonekrotický toxin (letální toxín)	16
1.3.4. Tracheální toxin	17
1.3.5. Endotoxín	17
1.3.6. Vlákničný hemaglutinin	17
1.3.7. Aglutinogeny	17
1.3.8. Pili a pertacin	17
1.4. Patogeneze	18
1.4.1. Vlastnosti a úlohy biologicky aktivních látek	18
1.5. Klinický obraz onemocnění vyvolané <i>Bordetella pertussis</i> a <i>Bordetella parapertussis</i>	19
1.5.1. Komplikace	21
1.6. Epidemiologie	22
1.6.1. Nemocnost pertusí v ČR	23
1.6.2. Nemocnost podle věku a skupin	23
1.7. Očkování proti pertusi	24
1.7.1. Celobuněčná a acelulární vakcína	24
1.7.2. Současné očkování v České republice	25

1.8. Léčba <i>Bordetella pertussis</i> a <i>Bordetella parapertussis</i>	26
2. Cíl práce a hypotézy	29
2.1. Cíl práce	29
2.2. Hypotézy	30
3. Metodika	31
3.1. Charakteristika zkoumaného souboru	31
3.2. Odběr, uchovávání a transport do mikrobiologické laboratoře	32
3.2.1. Odběr	33
3.2.2. Uchovávání a transport	33
3.3. Kultivační diagnostika	33
3.3.1. Kultivační půdy	34
3.3.1.1. Půda Bordetova-Gengauova	34
3.3.1.2. Půda Bacto Charcoal Agar (Difco 0048-15-8)	34
3.3.1.3. Půda Regan_Lowe agar	35
3.3.1.4. Krevní agar	35
3.3.2. Postup rozočkování bakterie na půdu Bordet-Gengou	35
3.3.3. Faktory pro úspěšnou kultivaci a faktory snižující záchyt <i>B.pertussis</i> při kultivačním vyšetření	36
3.3.4. Identifikace bakterií na pevných půdách	37
3.3.5. Oxidázová a Ureázová reakce	38
3.3.6. Ověření sklíčkovou aglutinací	38
3.3.7. Barvení podle Grama	38
3.3.8. Stanovení citlivosti na antibiotika	39
3.3.8.1. Kvalitativní průkaz citlivosti na ATB	39
3.3.8.2. Stanovení citlivosti na ATB kvantitativním způsobem.....	42
3.3.9. Celý kultivační proces diagnostiky <i>bordetella pertussis</i> a <i>bordetella parapertussis</i> prováděný v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o	43

3.4. Sérologická diagnostika	49
3.4.1. Stručný popis vyšetření IgG protilátek toxinu <i>Bordetella pertussis</i> v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o.	50
3.4.2. Porovnání serologie a kultivace	51
3.5. Dotazník	52
4. Výsledky	53
4.1. Rozlišení <i>B.pertussis</i> a <i>B.parapertussis</i>	53
4.2. Výskyt <i>Bordetella pertussis</i> a <i>Bordetella parapertussis</i> v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. za poslední 3 roky	55
4.3. Výskyt <i>Bordetella pertussis</i> a <i>Bordetella parapertussis</i> na jidřichohradecku za poslední 3 roky	59
4.4. Zpracování vyplněných dotazníků od praktických lékařů Jindřichova Hradce a okolí	63
4.4.1. Shrnutí informací získaných z vyplněných dotazníků	70
5. Diskuze	71
6. Závěr	73
7. Klíčová slova	75
8. Seznam použitých zdrojů	76
9. Přílohy	80

Úvod

Téma Současná problematika *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* jsem si vybrala kvůli jejímu stálému akutně se vyskytujícímu onemocnění s rostoucí incidencí. Laická i odborná veřejnost je mnohdy přesvědčena, že právě pertuse byla díky proočkování naší populace vymýcena. Proto se stává, že v diferenciální diagnostice se na ni nemyslí a stala se opomíjenou infekcí.

Aerobní gram-negativní tyčka *Bordetella pertussis* je původcem syndromu pertuse nebo-li černého kašle, někdy známého i pod pojmem dávivý kašel. Projevuje se záchvaty kašle nebo zvracením. Onemocnění je vysoce infekční, postihuje dýchací cesty a patří mezi nejzávažnější infekční onemocnění dětského věku. Především během prvního roku života, před objevením očkovací látky, patřila mezi infekční nemoci s vysokou úmrtností. Nejčastěji jsou ohroženi právě kojenci. Onemocnění se začíná objevovat také po 10. roce života a může postihnout i dospělé, kteří bývají zdrojem infekce a nakazí své děti.

Další aerobní gram-negativní tyčka, kterou ve své práci zmíním je *Bordetella parapertussis*. Uvádím ho z důvodu onemocnění, které vyvolává. Jde o onemocnění podobné dávivému kašli, je ovšem kratší, mnohdy lehčí, ale nemusí tomu tak vždy být.

Lékem volby je erythromycin, případně další makrolidy. Pokud jsou kmeny rezistentní k erytromycinu další možností může být cotrimoxazol.

Při podezření na onemocnění vyvolané kmeny *Bordetella pertussis* nebo *Bordetella parapertussis* je důležité, aby byl zaslán optimální biologický materiál, kterým je výtěr z nosofaryngu nebo laryngu.

V této práci se budu hlavně zabývat kultivací neboli přímým průkazem těchto dvou bordetell, které jsou svými kultivačními nároky od sebe rozdílné, ale obě dvě jsou růstově náročné. Mikrob je extrémně citlivý na vyschnutí a kultivace vyžaduje speciální média. Také se zmíním o dalším diagnostickém postupu, a to o nepřímém průkazu – sérologické diagnostice. Cílem práce je dokázat, do jaké míry se liší *Bordetella pertussis* a *B. parapertussis* v laboratorní kultivační diagnostice ve vzhledu a v chování. Zajímá mě také, jaká je jejich reakce na antibiotika a na jaké druhy antibiotik reagují. Chtěla bych také shrnout, na co si dát v laboratorní diagnostice právě těchto dvou

bordetell pozor. Dále mě zajímalo, jaký byl výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* za uplynulé 3 roky v laboratoři Laboma s.r.o. a na Jindřichohradecku. Dále mě zajímalo, jakou mají lékaři s pertusí zkušenost, jaké vyšetření požadují a jakou léčbu nasazují. V práci proto uvádím informace z dotazníků, které vyplnili lékaři z Jindřichohradecka a jeho okolí.

1. Současný stav

Bordetella parapertussis a *Bordetella pertussis* jsou původci infekcí postihující dýchací cesty. Původci jsou aerobní gram-negativní tyčky z rodu *Bordetella* a z čeledi *Brucellaceae*.

U jedinců napadených bakterií *Bordetella pertussis* se rozvine vysoce infekční onemocnění zvané černý kašel. U nakažených parapertusí jsou klinické projevy převážně mírnější než u nakažení pertusí. Z tohoto důvodu se ve světě dostává většího zájmu právě *Bordetella pertussis*. Přenos infekce se uskutečňuje hlavně kapénkovou cestou. K přenosu dochází nejčastěji v uzavřených místnostech a velkých kolektivech. Respirační onemocnění s kašlem, ale i syndrom černého kašle můžou způsobit i jiná agens, bakteriální i virová.

Největší nebezpečí představuje nakažení *Bordetella pertussis* v prvním roce života. Po zavedení povinného očkování v ČR v roce 1958 se počet onemocnění snížil na minimum. V posledních letech je nejen od nás, ale i z mnoha dalších zemí hlášen zvýšený výskyt infekce ve dvou skupinách. Do první skupiny spadají novorozenci a kojenci, další skupinou jsou dospělí. V dnešní době je vlivem očkování průběh pertuse méně závažnější než v minulosti.

Obranyschopnost proti infekci se snižuje po 3 až 5 letech po očkování či prodělaném onemocnění a po 12 letech vymizí. Vymizení obranyschopnosti je důkazem, že dospělí a adolescenti jsou nebezpečným faktorem nákazy pro dosud neočkované novorozence a kojence. U této skupiny má infekce až fatální průběh. Nejběžnějším zdrojem nákazy pro kojence jsou právě infikovaní dospělí.⁽¹⁵⁾

Onemocnění mohou provázet komplikace, které jsou nepřímo ovlivněné věkem pacienta. Pacienta postihují lehčí komplikace. K závažnějším patří komplikace způsobující až poruchu CNS nebo respiračního systému. Důležité je včas nasadit léčbu a zmírnit tak průběh onemocnění. K léčbě se volí makrolidická antibiotika, vůči kterým nejsou bakterie odolné. Pokud se jedná o infekci *B. pertussis*, je nutná terapie jak kvůli postiženému, tak kvůli jeho okolí.^(3,6)

1.1. *Bordetella parapertussis*

„Parapertussis“, latinsky „jako těžký kašel“. Způsobuje onemocnění podobné dávivému kašli. Průběh onemocnění je kratší a mírnější, ambulantního průběhu, jak se dříve předpokládalo. Dnes víme, že tomu tak nemusí vždy být. Patří stejně jako *Bordetella pertussis* do rodu *Bordetella* a do čeledi *Brucellaceae*.^(1,4)

1.1.1. Morfologické a fyziologické vlastnosti

Bordetella parapertussis je také jako *Bordetella pertussis* aerobní gram-negativní tyčka. Vzhledem se podobá kokům až tyčkám. Bakterie se nepohybuje, nesporuje a je opouzdřená. Kolonie *Bordetella parapertussis* jsou větší, šedostříbrné s výraznější beta hemolýzou, obklopené tmavě hnědým pigmentem. Beta hemolýza se projevuje jako žlutě zabarvené okolí kolonie. Při delší inkubaci dorůstají kolonie až velikosti 3 mm a poněkud vyčnívají z půdy.^(1,4,6)

1.1.2. Růstové a biochemické vlastnosti

Tato bakterie oproti *Bordetella pertussis* roste snadněji a rychleji. Je méně náročná. Roste i na běžných médiích, a to na krevním agaru, čokoládovém agaru, a někdy dokonce i na MacConkeyho půdě. Na Bordet–Gengouvově půdě vyrůstá po 24hodinové kultivaci a za 48 hodin je už dobře viditelná. *B. parapertussis* má ureázovou reakci pozitivní, ale oxidázovou reakci negativní a dobře roste za přítomnosti kyslíku.^(6,9,10)

1.2. *Bordetella pertussis*

„Pertussis“, latinsky „těžký kašel“. Je původcem syndromu pertuse, což je onemocnění černý kašel nebo-li dávivý kašel. Patří mezi rod *Bordetella* a do čeledi *Brucellaceae*.

Poprvé byla bakterie pozorována v roce 1900 mikrobiologem Julesem Bordetem ve sputu vlastního syna. Později se Bordeterovi a jeho spolupracovníkovi podařilo tuto bakterii vykultivovat. Koky zachytil na půdě s glycerol-bramborovým extraktem a 25-30% beraní krví. Bakterie se na plotnu s živým médiem dostávala tak, že byla nastavena před ústa nemocného dítěte.^(1,2,16)

1.2.1. Morfologické a fyziologické vlastnosti

Bordetella pertussis je aerobní gram-negativní tyčka. Mikrob je velmi malý a jemný. Po doteku kličkou se nepohybuje, ale rozetře se. Bakterie nespojuje, ale je opouzdřená. Povrch má pokrytý fibrilami, díky kterým se zachytí na řasinkách epiteliálních buněk horního dýchacího traktu. Kolonie jsou polokulovité a mají průhledný vzhled, perleťově se lesknou a také mohou mít úzkou zónu hemolýzy. Po delší inkubaci, což jsou 3–4 dny, bývají kolonie větší, lesklé a šedobílé. Připomínají tvarem kapky rosy. Dorůstají velikosti až 2 mm. ^(1,6)

1.2.2. Růstové a biochemické vlastnosti

Růst bakterie je pomalý a nesnadný, protože bývá zakryt jinými bakteriemi z lidského nosohltanu (gram-pozitivnímy zárodky). Na běžných půdách jsou některé části agarů pro ni toxické. Velmi dobře se pro růst bakterie osvědčila půda Bordetel Gengouovo s bramborovým extraktem, glycerolem a defibrinovanou 25% beraní krví. Na této půdě vyrůstá během 48–72hodinové kultivace. *B. pertussis* má pozitivní oxidasovou reakci, ale ureasovou reakci má negativní. Nezkvašuje cukry, oxiduje však aminokyseliny. Jelikož je to bakterie aerobní, tak dobře roste za přítomnosti kyslíku. ^(9,16)

1.2.3. Citlivost na zevní podmínky

Bordetella pertussis je velmi citlivá na sluneční záření, teplo a vyschnutí. V nosohltanovém sekretu vydrží naživu zaschlá pouze několik hodin. Optimálně roste při teplotě 35–37 °C. Vyšší teplota např. 55 °C ji zničí už za půl hodiny. Pokud se dostane mimo lidský organismus, rychle hyne. ⁽⁶⁾

1.3. Hlavní biologicky aktivní látky *Bordetella pertussis*

B. pertussis produkuje řadu látek – adhezínů, fibrilárních faktorů a toxinů. Některé jsou spojené s adhezí a kolonizací (filamentózní hemagglutinin, pertaktin, pertusový toxin), některé hrají roli v rozvoji klinického onemocnění (pertusový toxin, adenylatcyklázový toxin, dermonekrotický toxin, tracheální cytotoxin). ^(16,17)

1.3.1. *Pertusový toxin*

Je to toxin, faktor adheze a kolonizace. Je hlavním nositelem patogenních vlastností pertuse. Díky němu dochází k lepší vazbě mikroba na řasinky epitelu dýchacích cest, podporuje produkci hlenu, zlepšuje lymfocytózu. Pertusový toxin netvoří *Bordetella parapertussis*, a proto je původcem klinicky méně závažného onemocnění. Skládá se ze dvou subjednotek. A to z tzv. toxické subjednotky S1 a z 5 vazebných subjednotek S2, S3, S4 (v molekule toxinu jsou vždy přítomny dvě tyto subjednotky, je tedy dvojitá) a S5. Subjednotka S1 se označuje také jako ADP-robosyltransferasa. Tento polypeptid přenáší ADP-rybosylovou část NAD na membránu. Na membráně je vázaný regulační protein, který za normálních okolností utlumuje adenylátcyklasu. Kvůli výslednému potlačení aktivity regulačního proteinu dochází k podnícení syntézy adenylátcyklázy. Tím dochází k intenzivnějšímu vylučování sekretu respiračním epitelem a k tvorbě hlenu. Popsaná reakce je charakteristická pro paroxysmální (konvulzivní) fázi černého kašle. ⁽⁴⁾

První z vazebné subjednotky je subjednotka S2, která se váže na povrchu řasinkových buněk. Na povrchu buněk je glykolipid – laktosylceramid. Subjednotka S3 se přichycuje na fagocytující buňky, kterými jsou polymorfonukleární leukocyty. Dochází na jejich povrchu k množení glykoproteinového receptoru CR3. Vytvoří větší počet vazebných míst pro vláknitý hemaglutinin. ⁽⁴⁾

1.3.2. *Adenylát-cyklázový toxin*

B. pertussis také tvoří a uvolňuje vlastní adenylcyklázu tzv. adenylát-cyklázový toxin, který potlačuje chemotaxi leukocytů, snižuje fagocytární aktivitu makrofágů a tím vlastně podporuje počátečního stupně rozvoje infekce. ⁽⁴⁾

1.3.3. *Dermonekrotický toxin (letální toxin)*

Způsobuje vazokonstrikci, zánět a lokální nekrózu v místě působení *B. pertussis*. ⁽²³⁾ Známý je také pod pojmem termolabilní toxin, z buněk se uvolňuje po lýze. Protilátky proti němu nehrají v prevenci onemocnění žádnou podstatnou roli. Je odpovědný za

lokalizovanou destrukci tkání. Při nízké koncentraci způsobuje stažení cév, a to je doprovázeno místní ischemií. Je tedy zodpovědný za lokální zánět a nekrózu. Pokud tento toxin aplikujeme ve vyšších dávkách myším, objeví se u nich reakce neslučitelná se životem. ^(6,17)

1.3.4. Tracheální toxin

Jsou to peptidoglykanové fragmenty buněčné stěny bordetell. Přiléhají k buňkám řasového epitelu dýchacího ústrojí.

Způsobuje utlumení pohybu řasinek epiteliálních buněk. Při vyšší koncentraci dochází až k vypuzení řasinkových buněk. Brzdí syntézu DNA, znesnadňuje nebo znemožňuje obnovu poškozených buněk. Způsobuje ztrátu mechanismu sloužícího k odstranění hlenu. ^(4,16)

1.3.5. Endotoxin

Endotoxin je složkou buněčné stěny. Má podobné aktivity jako lipopolysacharid gram-negativních bakterií. ^(4,17)

1.3.6. Vlákňitý hemaglutinin, glykolipidy, glykoproteinový receptor

Za adhezi bordetell k epitelu trachey a bronchů odpovídá pertusový toxin a také vláknitý hemaglutinin. Váže se na epiteliální membrány a rovněž na povrch polymorfonukleárních leukocytů. Fagocytované bordetelly jsou schopné intracelulárně perzistovat, chrání je to před protilátkami. ⁽⁶⁾

1.3.7. Aglutinogeny

Povrchové antigeny zodpovědné za aglutinaci bakteriálních buněk v přítomnosti odpovídajících látek. ⁽¹⁷⁾

1.3.8. Pili a pertactin

Dva nověji objevené adheziny, u kterých není ještě jejich role objasněna. ⁽⁶⁾

1.4. Patogeneze

Patogeneze onemocnění probíhá ve dvou fázích, v kolonizaci a toxemii. Patogeneze začíná vstupem bakterií do vnímavého hostitelského organismu, přilne k řasinkovému epitelu, pomnoží se a kolonizuje. Napadení organismus projeví, po uplynutí inkubační doby, jako onemocnění horních cest dýchacích. Dalším projevem je teplota, nevolnost a kašel, který se zvyšuje asi 10. den od začátku onemocnění. V tomto období se pertuse vyskytuje hojně v nazofaryngu a laryngu. Bakterie *B.pertussis* se vyskytují na povrchu epiteliálních buněk, neproniknou do buněk ani nevstoupí do krevního oběhu. Nasedají na řasinkový epitel respiračního traktu. Způsobují zde katarální zánět až nekrozu postižené sliznice. Typický kašel vzniká drážděním receptorů pro kašel a zároveň ztrátou mechanismu, který za normálních okolností z povrchu sliznic odstraňuje hlen. Pokud v tomto období nasadíme antibiotickou léčbu, omezíme závažnost a trvání onemocnění. ⁽¹⁶⁾

V druhé fázi se postupně prodlužují záchvaty kašle, které končí charakteristickým nádechem. Do krevního oběhu se dostávají toxiny produkované *B.pertussis* a způsobují tak systémové účinky. ⁽¹⁶⁾

1.4.1. Přehled vlastností a úloh biologicky aktivních látek v patogenezi

Vláknitý hemaglutinin (FHA) napomáhá k aglutinaci erytrocytů, způsobuje vazbu na ciliární epitel i na jiné buňky, napomáhá k vstupu bakterií do epiteliálních buněk a indukuje apoptózu. ⁽³⁾

Pertusový toxin (PT) způsobuje indukci lymfocytózy, inhibici agocytózy, zvýšenou citlivost k histaminu a zvýšenou sekreci inzulinu. ⁽³⁾

Adenylátcyklázový toxin (ATC) katalyzuje tvorbu cAMP (Cyklický adenosinmonofosfát), dále narušuje funkci leukocytů a způsobuje hemolýzu erytrocytů.

Tracheální cytotoxin (TCT) navozuje ciliostázu, poškozují tracheální epitel a inhibuje syntézu DNA. ⁽³⁾

Dermonekrotický toxin (DNT) způsobuje vazokonstrikci, fokální nekrozu buněk a alteraci imunitní odpovědi. ⁽³⁾

Lipopolysacharid (LPS) způsobuje indukci tvorby IL-1 a TNF-alfa, horečku a hypotenzy. Petraktin (PRN) způsobuje vazbu na dýchací epitel. Tracheální kolonizační faktor (TCF) má adhezivní úlohu. Faktor rezistence (BrkA) inhibuje komplement. ⁽³⁾

1.5. Klinický obraz onemocnění vyvolané *Bordetellou pertussis* a *Bordetellou parapertussis*

Bordetella pertussis vyvolává lidské onemocnění nazvané černý kašel nebo dráždivý kašel, anglicky Whooping cough. První zmínky o pertusi pocházejí ze středověku, a to z oblasti v Moultonově v roce 1540. O 78 let později se objevuje první známý popis epidemie pertuse, který podal Guillaume de Baillou z Paříže. Guillaumovy poznatky byly vydány až po jeho smrti v roce 1640. Onemocnění bylo pojmenováno v roce 1697 Sydenhamem, dostalo název pertussis. Whooping cough poprvé zazněl v roce 1701 v londýnské Bills of mortality. ⁽¹⁶⁾

Onemocnění je charakteristické dráždivým, v záchvatech se opakujícím kašlem často s „kokrhavým“ nádechem. U postiženého se objeví zarudnutí a promodráání v obličejí. Některé záchvaty kašle jsou zakončeny apnoickou pauzou nebo, jak už sám název (dávivý kašel) napovídá, zvracením. Z počátku však přichází onemocnění s příznaky běžné rýmy, s výraznějším slzením, zarudlými spojivkami a zvýšenou teplotou. Jsou to tedy příznaky, které jsou spojovány s běžnou virózou. Klinický obraz závisí na věku, stavu imunity, expozici a dalších faktorech. Klasický průběh onemocnění je pozorován u dětí do 10 let a můžeme ho rozdělit do tří stadií. ^(2,3,5,16)

Onemocnění probíhá obvykle těmito stadii:

- katarální stadium
- paroxysmální stadium
- rekonvalescentní stadium

V prvním, katarálním stadiu jsou příznaky, jako je rýma, kýchaní, mírný kašel nebo pokašlávání, slzení, konjunktivitida a subfebrilie. K celkovým příznakům patří nechutenství, únavnost a horečky, které mohou být nevýznamné. První období trvá většinou 10–15 dní. V této fázi lze podáváním antibiotik ovlivnit rozvoj choroby a zkrátit tak její trvání. ^(2,3,5,16)

V druhém, paroxysmálním stadiu je kašel výraznější a také frekvence se stupňuje. Vyznačuje se četnými a právě typickými záchvaty dráždivého kašle. Může se vyskytovat 5–20 krátkých epizod kašle, které se opakují v rychlém sledu za sebou. K záchvatům dochází častěji v noci a jsou vyčerpávající. Mohou být vyvolány jakýmkoliv zevním podnětem, např. změnou teploty. Pacient se mezi těmito sledy nestačí vůbec nadechnout. Po ukončení záchvatu dochází k hlubokému nadechnutí, které je spojováno s následným hlasitým sípavým nádechem jako „zakokrháním“. „Kokrhání“ je způsobeno tlačáním vzduchu zúženými hlasivkami. Díky tomu může dojít až k hypoxii a cyanóze. Na konci záchvatu dochází k tomu, že nemocný vykašle hlenovou zátku. Záchvat kašle může být doprovázen také zvracením, k čemuž dochází zejména u dětí. Počet záchvatů kašle za den může dosáhnout až 40. Proxysmální stadium trvá zhruba měsíc a pacient je po záchvatech značně vyčerpán. Vyčerpáním může působit unaveným dojmem a oteklým obličejem. Mezi záchvaty mohou být také pacienti zcela bez obtíží, tím je pertuse odlišná od jiných respiračních infekcí. V tomto stadiu je z laboratorních nálezů charakteristická lymfocytóza. ^(2,3,5,16)

Posledním stadiem je rekonvalescentní stadium, u kterého jsou záchvaty kašle mírnější, méně časté a kokrhání ustává. Pacient se začíná pomalu zotavovat. Kašel může přetrvávat měsíce, ale obvykle vymizí do tří týdnů. Pokud dojde k tomu, že přetrvává měsíce, tak se jedná o tzv. reflexní kašel, který ovšem nemá už charakter pertusových záchvatů. ^(2,3,5,16)

Může se také objevit toxická forma pertuse, která je ovšem vzácná a končí fatálně. Projevuje se vysokou horečkou, křečemi, bezvědomím, krvácením do kůže, spojivek i mozku. ^(2,3,5,16)

Nejzávažnější průběh onemocnění je u neimunních kojenců. U adolescentů a dospělých má nemoc mírný průběh. Má charakter nespecifických zánětů horních cest

dýchacích nebo bronchitidy. Stav se může podceňovat či mylně diagnostikovat a může tak docházet k šíření bakterie do okolí nemocného člověka. ^(2,3,5,16)

Bordetella parapertussis vyvolává respirační onemocnění s kašlem, které může být lehčího rázu, ale nemusí to vždy platit. Onemocnění má, na rozdíl od onemocnění vyvolané *B. pertussis*, kratší dobu trvání. Typické je kratší katarální a paroxysmální stadium. Onemocnění není smrtelné ani neléčené. ^(2,3,27)

1.5.1. Komplikace

Výskyt komplikací je příměrně věku pacienta. Čím je věk nemocného při onemocnění vyšší, tím se snižuje pravděpodobnost výskytu komplikací. U nemocného s nižším věkem, např. u kojenců, je pravděpodobnost výskytu komplikací vysoká. ⁽¹⁶⁾

Mezi méně závažné komplikace řadíme např. traumatické defekty na jazyku, které jsou způsobeny záchvatem kašle. Může se jednat např. o poranění uzdičky jazyka. Dále k méně závažným komplikacím patří epistaxe (krvácení z nosu), hernie (kýla), vyhrzutí rekta, subkonjunktivální hemoragie, edém obličeje (otok). U pacienta může docházet k dehydrataci a úbytku potravy, vlivem zvracení a omezeného příjmu tekutin a potravy. U dětí je častý akutní zánět středouší. ^(3,16)

Mezi hlavní závažnější komplikace patří poruchy postihující dýchací cesty a nervový systém. Nemocný je ohrožen sekundární pneumonií, kterou vyvolávají pneumokoky (*haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*). Tyto komplikace mnohdy končily až smrtelně. Komplikace s postižením CNS jsou vzácné, projevují se křečemi, bezvědomím, obrnami nebo serózní meningitidou. ^(3,16)

Mezi významné změny způsobené hlavně účinkem pertusového toxinu patří leukocytóza, lymfocytóza, zvýšená vaskulární permeabilita. ^(3,16)

Někdy mohou po těžkém průběhu zůstat trvalé změny, jako je např. slepota, hluchota, mentální retardace, vzniklé nejspíše důsledkem mozkové anoxie (nepřítomnost kyslíku v organismu) a nebo u lokálních krvácení. ^(3,16)

1.6. Epidemiologie

Pertuse se vyskytuje na celém světě bez ohledu na podnebí, místo nebo rasu. Každý rok onemocní pertusí více než 50 milionů osob a 300 000 na nemoc zemře. V ČR větší pokles pertuse byl zaznamenán po zavedení povinného očkování. Vakcinace byla zavedena v roce 1959. Po roce 2000 počet případů vzrostl. Ročně je hlášeno několik set onemocnění. Počet hlášených případů parapertuse je o polovinu nižší. V době před zavedením očkování onemocnělo pertusí 20 % kojenců a 60 % batolat ve věku od 1 do 4 let. V zemích, kde vůbec není zavedeno očkování proti pertusi, zaujímají kojenci 50 % zemřelých na černý kašel. Smrtící kombinací bývá zpravidla pneumonie. Ve státech, kde bylo očkování zavedeno, výrazně poklesl počet onemocnění u malých dětí, ale počet onemocnění u mladistvých i dospělých stoupá. Je to způsobeno vymizením obranyschopnosti získané vakcinací. Průběh onemocnění u skupiny pacientů bývá mírnější. V některých případech nemusí být rozpoznána a v tomto případě nemocný šíří nákazu dál. K epidemiím pertuse dochází ve dvou až pětiletých intervalech. Onemocnění se přenáší osobním kontaktem vzdušnou cestou, a to buď kapénkami nejčastěji při kašlání nebo kýchání. Je tedy důležitý blízký kontakt s nemocným a vnímavým jedincem. Zdrojem nákazy je tedy nemocný člověk. Infekce je vysoce nakažlivá. Rychle se šíří v uzavřených kolektivech, jako jsou např. jesle, školky, školy, domovy mládeže, vysokoškolské koleje. Vzácně je také možný přenos předměty potřísněnými sekrety horních cest dýchacích. Onemocnění má sezónní výskyt, a to hlavně v zimních měsících roku. Více jak z 90 % onemocnění dochází z domácích kontaktů. Z 50–80 % dochází k přenosu mezi spolužáky ve škole. Nejohroženější populací jsou děti a kojenci do 3 měsíců. Období nakažlivosti bývá koncem inkubační doby nebo po celém paroxysmálním stadiu často i v rekonvalescenci. Laboratorně potvrzené případy pertuse se hlásí do systému EPIDAT, dále se hlásí i případy, u kterých byla diagnóza stanovena na základě klinického obrazu a epidemiologické souvislosti. Imunita po vakcinaci klesá po 5 letech. Také postinfekční imunita není trvalá, po letech dochází k poklesu ochranných protilátek. Imunita, která je zkřížená s parapertusí, neexistuje. ^(3,18,20)

1.6.1. Nemocnost pertusí v ČR

Dříve, než byla zahájena pravidelná vakcinace proti pertusí, se pohybovala nemocnost osob na území ČR ročně v několika desítkách tisíc osob. Od zahájení pravidelného očkování roku 1958, nemocnost pertusí postupně klesala. Nejmenší hodnoty byly zaznamenány mezi roky 1978 a 1989. Od začátku devadesátých let nemocnost pertusí v ČR stoupá ve tří až čtyřletých intervalech. ⁽²⁰⁾

Od roku 1996 až do roku 2005 bylo v ČR evidováno 2124 případů onemocnění pertusí. V roce 1996 onemocnělo pertusí 121 případů, v roce 2005 se nakazilo 412 osob. Od roku 2002 počet nemocných pertusí stoupá. V roce 2006 byla hlášena nemocnost pertusí v ČR 2,3 na 1000 000 obyvatel, v roce 2007 byl stav 1,8 na 100 000 obyvatel, v roce 2008 se dostala hodnota až k hladině nemocnosti 7,4 na 100 000 obyvatel a v roce 2009 stav zaznamenal opět nárůst na 9,1 na 100 000 obyvatel. (27,28)

V letech 1996–2005 bylo v ČR 1005 případů onemocnění parapertusí; 121 případů v roce 2005, 67 případů v roce 1996. Od roku 1985 do roku 1990 byl zaznamenán velký pokles nemocnosti. Od roku 1991 nemocnost parapertusí postupně narůstá. Stav parapertuse od roku 2005 do roku 2009 je mírně klesající. V roce 2006 byl stav onemocnění 1,0 na 100 000 obyvatel, v roce 2007 je stav onemocnění 0,4 na 100 000 obyvatel, v roce 2008 je stav onemocnění 1,2 na 100 000 obyvatel a v roce 2009 je stav onemocnění 0,8 na 100 000 obyvatel. ^(20,21)

Opakovatelnost výskytu obou nemocí v populaci vykazuje shodnou periodu (což je současný vzestup a pokles výskytu onemocnění). V posledních letech výrazně stoupá nemocnost pertusí. ⁽²⁰⁾

1.6.2. Nemocnost podle věku a skupin

Nejvyšší nárůst nemocných je u dětí 10–14 let. Postupně stoupá hlášení případů v letech 5–9, 15–19 a také ve skupině dětí mladších než 1 rok života. Právě ve skupině 0letých dětí byla zaznamenána 3 úmrtí, a to v roce 2005, 2007 a 2009. Ve všech třech případech šlo o dosud neočkovaného jedince do 1. roku života. Jako zdroj onemocnění byl prokázán starší sourozenec, rodič. Onemocnění ve skupině dospělých má rovněž nárůst. V letech 2001–2008 bylo hlášeno nejvíce případů nakažených dětí pertusí ve

věku mezi 10 a 13.lety. V tomto období se kvalita očkovací látky snižovala či úplně vymizela, proto se v pozdějších letech přešlo na přeočkování této věkové kategorie. ⁽²¹⁾

1.7. Očkování proti pertusi

Před zahájením očkování způsobovala pertuse nejčastější úmrtí v dětském věku. První vakcíny obsahovaly usmrcené celé bakterie *B. pertussis* a lišily se obsahem, ale také způsobem přípravy. Brzo u očkovanych jedinců byl rozpoznán přímý vztah mezi produkcí protilátek a počtem bakterií obsažených ve vakcíně. Právě s počtem mikroorganismů přímo souvisela i toxicita, která se projevuje různými komplikacemi po očkování. ^(13,16,22,23)

1.7.1. Celobuněčná a acelulární vakcína

Začátky pokusů o imunizaci se objevují už v dobách 1. světové války, kdy byla ve Spojených státech připravena první celobuněčná inaktivovaná protipertussová vakcína. Celobuněčné vakcíny jsou vyráběny v mnoha zemích a jejich základní příprava je podobná: bakterie jsou nejprve usmrceny a částečně detoxikovány teplem, chemicky nebo kombinací těchto metod. Čisté suspenze inaktivovaných kmenů jsou vyráběné buď ze sbírkových kmenů, a nebo z kmenů izolovaných v populaci státu, kde vakcína vzniká. Očkovací látka by měla obsahovat hlavní povrchové antigeny, které se vyskytují v kmenech *B. pertussis*. K plošnému očkování došlo až o více než 30 let později. Od roku 1949 se tato inaktivovaná perkusová vakcína začala kombinovat s difterickým a tetanickým toxidem. Vzniklá trivakcína označovaná jako DPT. Účinnost této vakcíny byla vysoká a dlouhodobá. Imunita přetrvávala až do 12. roku, i když po 5. roku života došlo postupně k poklesu ochranného efektu. Poměrně často způsobovala DPT trivakcína postvakcinační reakce, a to horečku, zarudnutí, bolesti v místě vpichu. Reakce byly několikrát častější u aplikace trivakcíny DPT než u aplikace bivakcíny DT (záškrt a tetanus). Po trivaxíně se také objevovaly febrilní křeče (10 minut trvající křeče při prudce stoupající tělesné teplotě nad 39°C). Ojediněle se mohla objevit také encefalopatie (onemocnění mozku). Nežádoucí reakce byly způsobovány pertussovou složkou vakcíny, kterou trivakcína, na rozdíl od bivakcíny, obsahuje. Kvůli výskytu

nežádoucích příhod se přestalo v některých zemích proti pertusi očkovat. Jednalo se např. o Velkou Británii, Japonsko, Švédsko. To však mělo za následek, že v těchto zemích se opět vyskytly případy onemocnění se stovkami úmrtí. Očkování bylo opět obnoveno. V České Republice bylo očkování proti pertusi zařazeno do očkovacího kalendáře v roce 1958. Jednalo se právě o trivakcínu DPT. ^(16,22,23,24)

V roce 1981 byla připravena první acelulární pertussová vakcína pro děti od dvou let známá pod názvem Takeda vakcína. Vznikla v Japonsku odhalením a výběrem jednotlivých antigenů *B. pertussis*, které vyvolávají u hostitele imunní odpověď potřebnou k prevenci onemocnění. Acelulární pertussová vakcína obsahuje různá množství inaktivovaného pertussového toxinu, pertaktinu, filamentózního hemaglutininu a dva typy fimbrií. Acelulární pertussová vakcína je buď samostatná a nebo v kombinaci s dalšími očkovacími látkami. Vakcína je bezpečnější s méně častými nežádoucími příhodami. Poprvé byla vyzkoušena v letech 1986 u šestiměsíčních dětí ve Švédsku. Ukázala se být neškodná a efektivní v 70 % případů, proto zanedlouho byly takové vakcíny připraveny i v jiných zemích a zavedeny do praktického použití. ^(13,16,22,23)

1.7.2. Současné očkování v České Republice

V ČR se od roku 2007 plošně očkuje proti pertusi acelulární vakcínou, která je složena ze tří komponent. Vakcína je součástí kombinované hexavakcíny Infanrix Hexa. K přeočkování v 5 letech se používá vakcína Infanrix a uvažuje se o přeočkovávání i v adolescenci a dospělosti, a to např. vakcínou Boostrix. ⁽²²⁾

Vakcína Infanrix Hexa a Infanrix obsahují v pertusové vakcíně tři komponenty: pertusový anatoxin, filamentózní hemaglutinin a pertaktin, které jsou přichyceny na hydratovaný hydroxid hlinitý. Vakcína Infanrix Hexa se aplikuje po ukončení 13. týdne věku a mezi dávkami je interval nejméně 1 měsíc. Vakcínou Infanrix se přeočkovává v 5. roce života. Vakcína Boostrix je verze vhodná pro adolescenty a dospělé uživatele, obsahuje redukované množství antigenu: pertussového anotoxinu, filamentózního hemaglutininu, proteinu zevní membrány, které jsou přichyceny na hydratovaný hydroxid hlinitý a fosforečnanu hlinitý. Standardně se aplikuje v 1.–12. roce života

a poté v každých desetiletých intervalech. Může se ovšem také podávat osobám po dosažení 4. roku života. Měsíc po ukončení základního očkování byla imunitní odpověď na jednotlivé pertusové antigeny mezi 97,2–99,3 % (pertusový toxin), 95,2–100 % (filamentový hemaglutinin) a 95,9–99,3 % (pertaktin).⁽²²⁾

Infanrix Hexa a Infanrix se nemohou aplikovat u dětí, u kterých se do sedmi dnů po předchozím očkování vyskytla encefalopatie. Očkování se přeruší a dále se očkuje jen kombinovanými vakcínami bez pertusové složky. Dále musí být odložena u osob trpících vážným akutním horečnatým onemocněním.⁽²²⁾

Pokud je vhodný jedinec naočkován, může se u něho objevit několik nežádoucích účinků. V průběhu prvních 48 hodin po očkování se může objevit slabé zarudnutí, otok, zatvrdnutí či mírná bolest v místě vpichu, reakce mohou přetrvávat po dobu jednoho či dvou dní. Dále se může objevit horečka od 38–40°C, spavost podrážděnost, neobvyklý pláč, otok dolních končetin nebo oblasti deltového svalu. Tyto projevy mohou přetrvávat po dobu 24–48 hodin a výjimečně jsou doprovázeny křečemi. Jen vzácně byly pozorovány alergické reakce na složky vakcíny.⁽²²⁾

Očkovací látky musí být uchovávány při teplotě 2–8°C. Před podáváním nebo ředěním musí být vakcína řádně zkontrolována. Nesmí po vizuální kontrole obsahovat makroskopicky patrné cizorodé částice a nesmí mít změněný vzhled. Doba použitelnosti je vyznačena na štítku a na vnějším obalu. Je to doba 36 měsíců ode dne výroby.⁽²²⁾

Očkování proti černému kašli je povinné u kojenců, batolat i u předškoláků. V roce 2009 bylo zavedeno další povinné přeočkování mezi 10. až 11. rokem života. Podnětem k zavedení nového přeočkování byl vzrůstající výskyt černého kašle v České republice u 9–15letých dětí. Problém představují ročníky narození 1998 a starší, kteří se novému přeočkování „vyhnuli“ a jejich ochrana před onemocněním je mizivá. Může dojít k závažné situaci, kdy nakažení jedinci infikují malé děti do jednoho roku.⁽³⁰⁾

1.8. Léčba nákazy *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*

Terapeuticky vhodná antibiotika jsou taková, která jsou účinná ve sliznici dýchacích cest a pronikají také do hlenu. Vhodnou volbou jsou makrolidová antibiotika. Patří mezi ně *erythromycin*, *clarithromycin*, *azithromycin*. Beta-laktamová antibiotika nejsou hodná,

nedosahují totiž účinných koncentrací na sliznici dýchacích cest, a jsou proto pro pertusi neúčinná. ^(3,16)

Makrolidy mají schopnost se navázat na ribozomální RNA a inhibovat proteosyntézu. Vytvoří peptidickou vazbu a brání uvolnění tRNA. Makrolidy dělíme do dvou skupin, a to do skupin první starší generace antibiotik a nebo do druhé mladší generace. Mezi zástupce starší skupiny patří *erytromycin*, *spiramycin*. Do mladší skupiny patří *roxithromycin*, *azithromycin*, *clarithromycin*. ⁽⁶⁾

Makrolid první generace, *erytromycin*, je svým spektrem podobný penicilínu. Erythromycin je dobrou volbou léčby streptokokových infekcí právě u pacientů, kteří jsou přecitlivělí na léčbu penicilínem. Také dobře účinkuje na řadu dalších bakterií, např. hemofily, buricely, legionely, mykoplasmata, chlamydie. U streptokoků a hemofilů musíme počítat s kmeny, které jsou mnohdy na erythromycin rezistentní (odolné). ⁽⁶⁾

Erytromycin se vylučuje převážně žlučí. Po jeho podání se může často dostavit nevolnost a zvracení. Pokud se kombinují s beta-laktamy nebo linkosamidy působí protikladně. Při léčbě se nesmí kombinovat. ⁽⁶⁾

Přeměnou molekuly erytromycinu se získávají nové antimikrobiální látky nazývané *ketolidy*. Jedním z nich je *telithromycin*, který působí na gram-pozitivní koky a zachovává si účinnost na ty mikroby, kteří jsou rezistentní na erythromycin. ⁽⁶⁾

Dalším ze starších makrolidů je *spiramycin*, který má ze všech antibiotik nejmenší toxický účinek. Využívá se k léčbě toxoplasmózy a kryptosporidózy. ⁽⁶⁾

Mezi makrolidy druhé generace se řadí roxithromycin i přesto, že má účinnost srovnatelnou s erytromycinem. Působí proti při léčbě atopických pneumonií. ⁽⁶⁾

Dalšími z mladších makrolidů jsou *azithromycin* a *clarithromycin*. Azithromycin stačí podávat jednou denně, protože má dlouhý biologický poločas. Působí dobře na gram-negativní bakterie a na protozou. Clarithromycin se podává dvakrát denně. Účinkuje lépe na gram-pozitivní bakterie, chlamydie, ureaplasmata, borrelie, mykobakterie, legionely, gardnerely, z anaerobů působí na prevotely, propionibakteria. ⁽⁶⁾

Makrolidová antibiotika se podávají v plné denní dávce po dobu 14 dní, v této době by mělo dojít k definitivní likvidaci bacilů a nehrozí jejich návrat. Dojde-li k léčení

v katarálním nebo na začátku záchvatového stadia, ovlivňují antibiotika počet záchvatů, dochází ke zkrácení nemoci a snížení komplikací. V pozdějších stadiích antibiotika klinický průběh výrazně neovlivňují, ale také dochází k likvidaci bakterie a tím ke zkrácení nakažlivosti nemocného. Vylučování *B. pertusse* ustává už do 7. dne po nasazení chemoterapie. U reflexního kašle se osvědčilo podávat guajacuran. Jedná se o kašel, který trvá dlouhou dobu a vyčerpává postižené dítě i jeho okolí. Doporučuje se také přeléčit rodinné příslušníky bez ohledu na věk, imunizaci nebo příznaky. ^(15,16,6)

Pacient by měl být izolován několik týdnů nebo až do doby, než je jeho kultivační nález negativní. Léčíme ho buď doma, nebo na infekčním oddělení, kam jsou odeslány těžké a komplikované případy. Pokud je dítě ošetřováno doma, dbáme o dostatek čerstvého vzduchu a podáváme mu výživnou, ovšem nedráždivou potravu. ^(3,6,16)

Léčba onemocnění vyvolané *B. parapertussis* je stejná jako u léčby pertuse. ⁽⁶⁾

2. Cíl práce a hypotézy

2.1. Cíl práce

Cílem bakalářské práce je osvojení praktických znalostí správné laboratorní praxe jak u bakteriálního kultivačního vyšetření výtěrů z nazofaryngu při podezření na výskyt bakterie *Bordetella parapertussis* a *Bordetella pertussis*, tak u určování citlivosti na antibiotika u izolovaných kmenů *Bordetella parapertussis* a *Bordetella pertussis*.

Dalším sledovaným cílem bylo zjištění četnosti výskytu *Bordetella parapertussis* a *B. pertussis* z Jindřichohradecka a ze vzorků zpracovaných mikrobiologickou laboratoří Laboma s.r.o. v populaci dětí, mladistvých, dospělých i seniorů. Získané výsledky výskytu bakterie jsem zpracovala statisticky.

Dále jsem se zajímala o postupy lékařů při podezření na infekci dýchacích cest způsobenou bakterií *Bordetella pertussis*. Informace jsem získávala pomocí dotazníků.

Vytyčení cílů do několika bodů:

1. shrnutí obecných znalostí a jejich využití při kultivační diagnostice a identifikaci bakterie *B. parapertussis* a *B. pertussis*
2. provedení kultivačních a identifikačních metod v rámci laboratorní praxe
3. určení citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika
4. zjištění a vyhodnocení dat z Jindřichohradecka, ze vzorků zpracovaných mikrobiologickou laboratoří Laboma s.r.o. o četnosti výskytu bakterie *B. parapertussis* a *B. pertussis* v jednotlivých letech v průběhu posledních 3 let
5. vyhodnocování a statistické zpracování získaných výsledků
6. vyhodnocení a shrnutí lékařských postupů při podezření na infekci bakterií *B. pertussis*

2.2. Hypotézy

Hypotéza 1:

Kultivační diagnostika *Bordetella parapertussis* bude nejen časově méně náročná než diagnostika *Bordetella pertussis*.

Hypotéza 2:

Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* je vyšší v podzimních až zimních a jarních obdobích.

Hypotéza 3:

Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* je nejčastější ve věkové skupině dětí 10–14 let.

3. Metodika

3.1. Charakteristika zkoumaného souboru

Data pro vytvoření své bakalářské práce jsem sbírala v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. v Českých Budějovicích. Kultivačně vyšetřovaný materiál pocházel z terénních ordinací od praktických lékařů i odborných specialistů z jižních Čech.

Sběr dat jsem uskutečnila v období od 1. ledna 2010 do 30. prosince 2010. Výsledky získané kultivací se týkaly každého materiálu, který byl podezřelý na obsah bakterie *Bordetella parapertussis* a *Bordetella pertussis* v uvedeném časovém rozmezí. Metody, kterými byly výsledky získávány, jsou popsány níže. Metody poukazují na schopnosti růstu, na citlivost bakterií na jejich vlastnosti a jejich vzájemné odlišení.

Další hodnocení výsledků se týkalo situace výskytu a problematiky *Bordetella parapertussis* a *B. pertussis* v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. během roku 2010 a během roků 2008–2009 a odlišnosti během sledovaných let. Zařadila jsem do své práce statisticky zpracované informace za poslední 3 roky, které mi byly poskytnuty z databází laboratoře Laboma s.r.o.

Práce také obsahuje shrnutí výskytu *Bordetella parapertussis* a *B. pertussis* z Jindřichohradecka za uplynulé 3 roky. Potřebná data byla získávána a zpracovávána z dat Hygienického ústavu v Jindřichově Hradci.

V poslední části jsem se zaměřila na informace od praktických lékařů pro děti a dorost a od praktických lékařů pro dospělé. Dotazníky byly vyplněny lékaři z Jindřichova Hradce a okolí a vztahovali se na problematiku pertuse. Informace jsem vyhodnocovala z řádně vyplněných dotazníků. Rozdala jsem 18 dotazníků pro praktické lékaře pro dospělé a dalších 18 dotazníků od praktických lékařů pro děti a dorost. Dotazníky obsahují 10 otázek a jsou uvedeny v části Přílohy. Z celkového počtu 36 dotazníků se vrátilo 30 řádně vyplněných dotazníků. Někteří respondenti odmítli dotazník vyplnit. Konečný sledovaný soubor tvořil 15 respondentů z ordinace praktických lékařů pro děti a dorost a 15 respondentů z ordinace praktického lékaře pro dospělé.

3.2. Odběr, uchovávání a transport materiálů do mikrobiologické laboratoře

3.2.1. Odběr

Materiál odebíráme sterilně a zasíláme v čistých a sterilních nádobkách. Odběr se provádí na začátku onemocnění na lačno, nebo 3 hodiny po jídle a pití a před zahájením léčby ATB. Nejlépe je provádět jej v ranních hodinách. Před odběrem se nesmí kouřit ani by neměla být prováděna ústní hygiena. Ke kultivačnímu vyšetření se odebírá výtěr z nazofaryngu a laryngu. ⁽¹¹⁾

Výtěr z nazofaryngu se provádí suchým sterilním vatovým tamponem na drátu. Nepoužívají se bavlněné tampony, které obsahují mastné kyseliny a ty jsou pro *B. pertussis* toxické. Mohou se používat např. tampony kalcium algiant. Odběr můžeme provést dvěma způsoby, a to buď přes dutinu nosní nebo ústní. Ideální je výtěr přes dutinu nosní, u kterého používáme dva tampony – na každý nosní průduch jeden. Tampon jemně zasuneme nosní dutinou až k zadní stěně nosohltanu. Na sliznici bychom tampon měli několik sekund ponechat a otáčet jím, aby se dostatečně nasákl slizničním sekretem, a poté ho opatrně vyndat. Tampon pro druhý způsob výtěru, a to přes dutinu ústní se musí před výtěrem ohnout o okraj zkumavky do úhlu. Jazyk se zafixuje dřevěnou špátlí. Tampon se zavede bez dotknutí sliznic dutiny ústní a měkkého patra do klenby nazofaryngu, kde se oře o zadní a horní stěnu. Délka zahnuté části se pohybuje v rozmezí 2–4 cm podle stáří vyšetřovaného jedince. Po výtěru tampon nenarovnáváme, ale zanoříme do transportního média. ^(8,11)

Výtěr z laryngu se provádí, stejně jako výtěr z nazofaryngu, v ranních hodinách, nalačno a bez ústní hygieny. Výtěr provádíme 3 cm od konce ohnutým tamponem na drátě. Kořen jazyka zafixujeme a tampon zavedeme za epiglottis. Vyvoláním kašlajícího reflexu docílíme ulpívání kapének na tamponu. Po skončení odběru drát narovnáme o vnitřní stěnu zkumavky a zasuneme do transportní půdy. Výtěr z laryngu se v současnosti už nedoporučuje. ^(8,11)

Další podmínkou je jednoznačná identifikace vzorku, na kterém musí být uvedeno jméno a příjmení pacienta, rodné číslo a druh materiálu. Materiál musí být provázen žádankou, na které se kromě již zmiňovaných údajů vyskytuje ještě diagnóza, zdravotní

pojišťovna, IČZ, adresa žadatele, datum a čas odběru a případná již aplikovaná antibiotická terapie. ⁽¹⁹⁾

3.2.2. Uchovávání a transport

Na transportní tampon se před vyočkováním přidává cephalosporin první generace např. cefalexin nebo cefalosporin. Cefalexin nebo cefalosporin by měl potlačit růst gram-pozitivních mikrobů fyziologické flóry. Média neobsahují žádné využitelné zdroje dusíku. Bordetellám nevyhovují běžná transportní média, jako jsou Stuartovy půdy. Novější typy půd obsahují aktivní uhlí a škrob a jsou obohaceny niacinem. K potlačení růstu se může použít i cefalosporin. Po výtěru tampon zanoříme do transportního média-AMIES, které obsahuje aktivní uhlí. Po celou dobu transportu uchováváme materiál pokud možno při pokojové teplotě. Doba od transportu do vyočkování by neměla přesáhnout 24 hodin. Pokud byl použit k odběru tampon bez transportní půdy, je nutné provést vyočkování na kultivační půdy nejméně do hodiny. Mohlo by dojít k vyschnutí bordetelly. Pokud není možné materiál rychle zpracovat, můžeme ho zmrazit v ledu až po dobu dvou dnů. ⁽⁸⁾

Materiál do laboratoře „Laboma“ je dovážen v průběhu dopoledních hodin. Objeví-li se v zaslaném materiálu výtěrový tampon bez transportního média, laboratoř kontaktuje lékaře. Lékaři je zaslán výtěrový tampon s transportním médiem pro další zaslání odběry.

3.3. Kultivační diagnostika

Kultivační vyšetření je diagnostickým standardem v průkazu onemocnění. Řadí se mezi přímé průkazy bakterie. Kultivace se provádí na speciálních kultivačních půdách. Nutností je předem požádat laboratoř, aby vhodné půdy připravila. Patří k nim půdy: Bordetova-Gengouova Agar, Bacto Charcoal Agar, Regan_Lowe Charcoal Agar s cefalosporinem. ⁽¹⁰⁾

Půda na kultivační plotně by měla být dostatečně vysoko vylitá, aby nedocházelo k zhoršování kultivačních podmínek během růstu bakterií. Plotny by se měly inkubovat

při 35–37°C po 7 dní a denně odečítat. Kultivační vyšetření se má provádět vždy při podezření na onemocnění! ⁽¹⁰⁾

3.3.1. Kultivační půdy

3.3.1.1. Půda Bordetova-Gengouova

Půda Bordetova-Gengouova je obohacená půda k izolaci *Bordetella pertussis* a *B. parapertussis*. Agarový základ půdy tvoří bramborová infuze, která se rozvaří v 1 % roztoku glycerolu. Dále obsahuje 15 až 20 % čerstvé defibrilované nejlépe králíčí, ale i beraní krve. ⁽⁷⁾

Modernější půdou k izolaci původců dávivého kašle je agar s aktivním uhlím doplněný inhibitory normální flóry (např. cefalosporinem). ⁽⁷⁾

Bordet Gengou Agar Base (Difco) je půda původního složení k izolaci *B. pertusse* a *B. parapertusse*. Skládá se z bramborové infuze (125,0 g/l), chloridu sodného (NaCl 5,5 g/l), agaru (20,0 g/l). Její pH je přibližně 6,7. Připravuje se rozmícháním 30 g základu v 1 litru v destilované nebo deionizované vody obsahující 10 g glycerolu, rozvaří se a sterilizuje 15 minut při 121°C. Po ochlazení na 45°C až 50°C se přidá sterilní krev do koncentrace 15 % i více. Po rozmíchání se vlévá do misek. ⁽⁷⁾

3.3.1.2. Půda Bacto Charcoal Agar (Difco 0048-15-8)

Půda Bacto Charcoal Agar se používá pro kultivaci a uchovávání náročných mikrobů, zvláště *Bordetella pertusis* a *B. parapertussis*. K izolaci bordetell z klinického materiálu se základ doplní 10 % defibrilované krve a selektivním suplementem obsahujícím cefalexin (do konečné koncentrace 40 mg/l). Půda je složena z infuze z hovězího srdce (500,0 g/l), peptonu (10,0), NaCl (chlorid sodný; 5,0 g/l), škrobu rozpustného (10,0 g/l), kvasničného extraktu (3,5 g/l), aktivního uhlí (4,0 g/l), agaru (18,0 g/l). Její pH je přibližně 7,3. Půda se připravuje rozmícháním 62,5 g navážky v 1 litru studené destilované nebo neionizované vody a za častého protřepání se rozvaří. Sterilizuje se v autoklávu 15 minut při 121°C. Autokláv provádí sterilizaci vlhkým teplým vzduchem a zvýšením tlaku. Po ochlazení na 45–0°C se médium zamíchá, aby

se docílilo homogenní suspenze aktivního uhlí, a rozlévá se do sterilních zkumavek k zatuhnutí v šikmé poloze nebo do misek. ⁽⁷⁾

3.3.1.3. Půda Regan-Lowe agar

Půda Regan-Lowe se používá pro uchovávání *B. pertussis* a *B. parapertussis*. Je složena z aktivního uhlí (4,0 g) a je doplněna defibrilovanou koňskou krví. Aktivní uhlí spolu se škrobem neutralizuje mastné kyseliny a peroxidy, které jsou pro bordetelly toxické. Dále obsahuje cephalixin, který inhibuje růst normální nosní flóry. Amfotericin potlačuje růst kvasinek a plísní. Pro udržení osmotické rovnováhy se přidává NaCl (chlorid sodný) a niacin (kyselina nikotinová). To je přidáváno za účelem podpory růstu. Uchovává se při 4–8°C. Půdy Regan-Lowe jsou dva typy, a to obohacená o cefalexin, která má označení RLA +, a nebo bez cefalorexinu, jež je označena jako RLA-. ⁽³¹⁾

3.3.1.4. Krevní agar

Půda krevní agar je nejpoužívanější půdou v kultivační diagnostice. Je to živný agar, ke kterému je přidána nejčastěji 5–10% sterilní defibrilovaná beraní krev. Výsledná hmota se vlévá do Petriho misek a nechá se ztuhnout. ⁽⁶⁾

Na krevním agaru se sleduje, zda bakterie tvoří hemolýzu pod nebo kolem kolonií. Kolem kolonií *B. parapertussis* je právě hemolýza na KA patrná. Na KA roste většina patogenních gram pozitivních i gram negativních bakterií. Slouží např. ke kultivaci streptokoků a stafylokoků. *Bordetella parapertussis* na ní vyrůstá z toho důvodu, že je méně citlivá než *Bordetella pertussis*, a proto ke svému růstu nepotřebuje speciální výživné prostředí, ve kterém je ještě potlačen růst jiných bakterií. ⁽⁶⁾

3.3.2. Postup rozočkování bakterie na půdu Bordet-Gengou

Diagnostika bakterie se provádí rozočkováním tamponu s odebraným hlenem na půdu tak, že se inokulum roztírá v kapce penicilinu zředěného do množství 1000 j./ml. ⁽¹⁰⁾

Inokulum by mělo být masivní a zabírat ¼ půdy v Petriho misce. Petriho miska slouží k tomu, aby na ní vyrostly jednotlivé izolované kolonie. Pro vytvoření inokula

použijeme sterilní kličku a rozočkujeme bakterie několika čarami (asi 4 čáry) směrem z inokula do volné části plotny. Kličku poté vyžháme. Vyžháním myslíme proces, kdy vložíme kličku do plamene, ve kterém se bakterie a jakýkoliv další materiál zničí. Dále misku pootočíme asi o 60 st. a totéž opakujeme novou čistou kličkou ještě třikrát. Naočkovanou Petriho misku ukládáme ke kultivaci do termostatu vždy víčkem dolů, aby se na něm neusazovala kondenzní voda. ⁽¹⁰⁾

Plotny inkubujeme při 35–37°C po 7 dní. Denně odečítáme plotny. Očkování je nutné provádět v čistém prostředí bez proudícího vzduchu, nejlépe v laminárním boxu. V místnosti je nutné zabránit prudšímu pohybu dalších osob a průvanu. Vlastní očkování je nutné provádět přísně asepticky, aby nedošlo ke kontaminaci. Petriho misky je potřeba řádně popsat na sklo vhodnou tužkou nebo centrofixem, aby nedošlo k záměně. Můžeme také použít samolepicí štítky. Petriho misky popisujeme na dno, aby nedošlo k záměně víček a tím i materiálu. ⁽¹⁰⁾

Po izolaci čisté kultury (nesmí být starší než 48 hodin) se pro ověření používá sklíčková aglutinace s diagnostickými séry anti *B. pertussis* a *B. parapertussis*. Izolované kmeny *B. pertussis* a *B. parapertussis* mají být posílány do NRL pro pertusi a difterii. ⁽¹⁰⁾

3.3.3. Faktory pro úspěšnou kultivaci a faktory snižující záchyt *B. pertussis* při kultivačním vyšetření

Kultivační vyšetření se stává úspěšné pokud včas získáme materiál, který je odebrán ještě před zahájením léčby ATB. Výtěr by měl být laryngální nebo nasofaryngeální, provedený na lačno. Aby byla kultivace úspěšná, musí být dodány materiály na dvou tamponech. Tampony by měli obsahovat např. kalcium arginát. Tampony by měly být zanořeny do transportního média a doba od odběru do transportu by neměla překročit 24 hodin. Nutností je řádně vyplněná žádanka na vyšetření pertuse. ^(6,7)

K faktorům snižující záchyt *B. pertussis* při kultivačním vyšetření patří neohebné vatové tampony, kontaminace vzorku, špatně provedený výtěr, transport na nevhodném médiu. Nemělo by dojít k prodloužení doby od odběru do transportu, hrozilo by

vysušení vzorku. Dalším snižujícím faktorem pro záchyt jsou nevhodné kultivační půdy a nedávné provedené očkování. ^(2,6,7)

3.3.4. Identifikace bakterií na pevných půdách

Na pevných kultivačních půdách rostou bakterie v charakteristických útvarech nazývané kolonie. Jde o čistou kulturu složenou z několika desítek až stovek milionů buněk stejného kmene určitého druhu bakterie. Podle vzhledu kolonií můžeme určit rod bakterií nebo alespoň odhadnout skupinu rodů, díky čemuž můžeme zúžit možnosti dalších vyšetřovacích postupů. ⁽⁹⁾

U kolonií si všímáme velikosti a tvaru. Velikost a tvar je většinou podobný a s prodlužováním kultivace se kolonie zvětšují. Tvar kolonie je pravidelný, kulatý. V mikroskopu tvoří bakterie *B. pertussis* a *B. parapertussis* kokobacily, které vypadají jako krátké tyčky až případně koky. Také si všímáme povrchu kolonie a barvy kolonie. *B. pertussis* tvoří průhledné perleťově se lesknoucí kolonie a *B. parapertussis* tvoří lesklé šedostříbrné kolonie. Kolonie můžeme také hodnotit zápachem, který se těžko popisuje a u *B. pertussis* a *B. parapertussis* není nezaměnitelný. Zápach je pouze nezaměnitelný u mladých kultur pseudomonád, které mají zápach po fialkách nebo po jasmínu. Dále kolonie posuzujeme podle pigmentace. U *B. parapertussis* je patrná tmavá pigmentace. Na krevním agaru hodnotíme hemolýzu, což je změna krevního barviva kolem kolonií. Hemolýzu rozdělujeme na alfa-hemolýzu, beta-hemolýzu a gama-hemolýzu. Alfa-hemolýza je neúplná hemolýza, hemoglobin se zabarví zeleně. Beta-hemolýza je úplná hemolýza, okolí kolonie je nažloutlé až průhledné projasnění. Beta-hemolýzu tvoří *B. parapertussis*. ^(6,9)

Pro odečtení bakterií je potřeba dobré osvětlení. Viditelnost drobných kolonií zlepší šikmé světlo. Pozorování plotny proti světlu umožňuje lepší viditelnost hemolýzy. V případě nejistoty v určení bakterie přeočkujeme téhož mikroba na několik dalších půd. ⁽⁹⁾

3.3.5. Oxidázová a ureázová reakce

Pro bakterii *Bordetella pertussis* je charakteristická pozitivní oxidázová reakce. Oxidázový test slouží k průkazu přítomnosti cytochromoxidázové aktivity mikroorganismů. ⁽²⁶⁾ Pro bakterii *Bordetella parapertussis* je charakteristický pozitivní test na ureázu. Testy jsou určeny pro detekci enzymu ureázy. ⁽⁶⁾

3.3.6. Ověření sklíčkovou aglutinací

Sklíčkovou aglutinací se určuje antigenní struktura kmenů. K ověření mikroba a určení jeho antigenní struktury jsou potřeba antiséra proti antigenům mikroba. Sklíčková aglutinace se využívá k průkazu bordetell a dalších bakterií, jako je např. citobakter, pseudomonáda, meningokok atd. ⁽²⁹⁾ Pokud dojde v kapce anitiséra a přenesené bakterie k aglutinaci, je bakterie potvrzena. Aglutinace znamená shlukování buněk, které je, nebo není okem patrné. Menší aglutinaci můžeme pozorovat pod mikroskopem. V mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o se používá pro ověření, zda se jedná o *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*, sklíčková aglutinace séry anti *B. pertussis* (Agglutinační sérum *Bordetella pertussis* REMEL Kat.č.R30165501) a anti *B. parapertussis* (Agglutinační sérum *Bordetella parapertussis* REMEL Kat.č.R30165601).

3.3.7. Barvení podle Grama

Pokud chceme zjistit, jak jsou mikroby velké, jaký mají tvar, jsou-li to koky nebo tyčinky, zda jsou rovné či zahnuté nebo jak jsou navzájem uspořádány (do dvojic, řetízků, shluků atd.), využijeme barvení podle Grama. To nám umožňuje také zjistit, zda jsou bakterie gram-pozitivní koky, gram-pozitivní tyčinky a gram-negativní tyčinky. Potom zhotovíme barvený nátěr podle Grama, který nám tohle vše spolu s dalšími možnostmi nabízí. Díky barvení podle Grama dokážeme rozdělit mikroby na modrofialově obarvené gram-pozitivní a na červeně zbarvené gram-negativní mikroby. Rozdíl v barvitelnosti způsobují rozdíly ve stavbě bakteriální stěny. V průběhu barvení se v buňce vytváří komplex krystalové violeti s jodem. Z gram-negativních mikrobů se pomocí alkoholu nebo acetonu tento komplex snadno vyplaví. U gram-pozitivních

mikrobů komplex v buňce zůstává. Schopnost mikrobů odlišně se barvit poprvé objevil dánský lékař Hans Christian Joachim Gram. Podstata Gramova barvení není dodnes přesně známa. Jedni tvrdí, že stěna gram-negativních bakterií obsahuje více lipidů než stěna gram-positivních bakterií. Alkohol či aceton v ní vytváří póry, kterými se barevný komplex lépe vyplavuje. Jiní zase tvrdí, že gram-positivní bakterie mají ve stěně silnější vrstvu peptidoglykenu. Tato vrstva se po kontaktu s alkoholem smrští a zpomalí tak únik komplexu krystalové violeti s jodem z buněk. Při barvení podle Grama se fixovaný preparát obarví nejprve krystalovou violetí, která bakteriální buňky barví na tmavomodrou nebo modrofialovou barvu. Poté se přidá Lugolův roztok, kvůli kterému vzniká v buňkách komplex barviva s jodem. Následuje působení acetonu nebo alkoholu, které způsobují odbarvení buněk. Tyto buňky patří mezi gram-negativní. V nátěrech se jeví jako červeně obarvené, což je způsobeno kontrastním barvivem, např. safraninem nebo zředěným fuchsinem. Použitá kontrastní barviva v barvení dle Grama tmavomodré zbarvení gram-positivních bakterií ovlivňují nepatrně. ⁽²⁹⁾

3.3.8. Stanovení citlivosti na antibiotika

Stanovení citlivosti na antibiotika je vyšetření, podle kterého poznáme citlivost mikroba na ATB a lékaři zvolí správnou léčbu. Metody stanovení citlivosti na ATB se dělí do dvou skupin. V prvním případě se jedná o metodu kvalitativního průkazu, do které patří nejběžněji používaný diskový difuzní test. V druhém případě ke stanovení citlivosti slouží kvantitativní metody, do kterých patří diluční metody. Při správném provedení testů na citlivost můžeme počítat s vysokou úspěšností na antimikrobiální léčbu. ⁽²⁹⁾

3.3.8.1. Kvalitativní průkaz citlivosti na ATB

Do kvalitativního průkazu citlivosti na ATB patří diskový difuzní test. Principem diskového difuzního testu je růst bakterií kolem disku. Citlivost mikroba se hodnotí podle zóny inhibice růstu mikroba. Jedná se o zónu kolem disku, kde mikrob neroste. Tato zóna se musí měřit a má u každého mikroba jiný průměr. Výsledky měření zóny se udávají v mm a každá má určitý minimální průměr. K testování citlivosti na ATB se

převážně používá agar Muellerův–Hinton. U *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* se používá k stanovení citlivosti na ATB půda Bordet–Gengau. Ke stanovení potřebujeme masivní pokrytí půdy, které se docílí politím agaru a odsáním přebytku nebo rozetřením pomocí vatového tamponku. Hustota inokula by měla odpovídat stupni 0,5 až 1 McFarlandovy zákalové stupnice. Pokud je půda naočkovaná, kladou se na ni antibiotické disky. Antibiotické disky jsou disky napuštěné antibiotiky s přesně stanovenou koncentrací, která musí být v disku dodržena. Disky se nesmí používat exspirované. Jejich kvalitu bychom měli ověřovat pomocí referenčních kmenů. K zjištění citlivosti na ATB u *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* se používají antibiotické disky obsahující ATB ampicilin, amoxicilin s inhibitorem, tetracyklin, azitromycin, cefuroxim, cotrimoxazol. Přehled antibiotických disků je uvedeno v Tabulce č. 1. Na misku se vejde nanejvýš 6 disků o průměru 9 cm. Disky se pokládají většinou „raznicí“ neboli „kolotočem“, který obsahuje maximálně 6 připravených disků. Připravené naočkované plotny se dají inkubovat dnem vzhůru standardně po dobu 18 hodin při 35–37°C. U *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* trvá stanovení citlivosti déle, protože jsou růstově náročnější. Po uplynutí dostatečné dlouhé inkubační doby se plotny odečtou. Pokud se narostlé kolonie začínají dotýkat svými okraji, ale nesplývají, je to známka správně vytvořeného inokula. Při odečítání diskového difusního testu měříme průměry inhibičních zón, které se dále srovnávají s hraničním průměrem inhibičních zón referenčního kmene stejného druhu. Pokud je kmen na ATB citlivý vytvoří kolem disku stejnou nebo větší inhibiční zónu. Pokud je kmen na ATB rezistentní vytvoří kolem disku menší inhibiční zónu. ⁽²⁹⁾ Druhy antibiotických disků a jejich průměrné inhibiční zóny jsou uvedeny v Tabulce č.1. Pokud je mikrob vůči ATB rezistentní, brání buď v průniku ATB do buňky nebo ho rychle vyloučí. Dalším způsobem, proč dochází k rezistenci mikroba na ATB, je inaktivace (zneškodnění) ATB vlivem bakteriálních enzymů. ⁽²⁹⁾

Tabulka č.1: Interpertace průměrů inhibičních zón

Kód	antibiotikum	Bakterie	citlivý	resistentní	Kód BioRad
AMC	Amoxicilin/Clavul.ac. 20μg/10μg		≥18	≤13	AMC
AMP	Ampicilin 10μg	G-tyčky	≥17	≤16	AM
		hemofily	≥22	≤18	
		β	≥26	≤18	
AMS	Ampicilin/Sulbactam 10μg/10μg		≥15	≤11	SAM
BAC	Bacitracin				BAC
CZL	Cefazolin 30μg		≥18	≤14	CZ
CTX	Cefotaxim 30μg		≥28	≤25	CTX
CRX	Cefuroxim 30μg		≥20	≤16	CXM
CMP	Chloramfenikol 30μg	Strepto	≥18	≤12	C
		hemofily	≥21	≤17	
			≥21	≤17	
CIP	Ciprofloxacin 5μg		≥21	≤15	CIP
CLI	Clindamycin 2μg		≥21	≤14	CLI
COL	Colistin 10μg		≥10	≤9	CS
ERY	Erytromycin 15μg	Stafylokoky	≥23	≤13	E
		Streptokoky	≥21	≤15	
FUR	Nitrofurantoin 300μg		≥17	≤14	FT
GEN	Gentamicin 10μg		≥15	≤12	GM

MTR	Metronidazol 4μg				MTR
NAL	Nalidixin 30μg				NA
OXA	Oxacilin 1μg	Stafylokoky	≥13	≤10	OX
		Pneumokoky	≥20	≤19	
OXO	Oxolinová kys. 10μg		≥19	≤13	OA
PEN	Penicilin 6μg	βstreptokoky	≥28	≤19	P
		gonokoky	≥30	≤26	
TET	Tetracyklin 30μg		≥19	≤14	TE
		hemofily	≥29	≤25	
		Streptokoky	≥23	≤18	
		Gonokoky	≥30	≤30	
COT	Trimetoprim/sulf 1,25μg/23,75μg Cotrimoxazol		≥16	≤9	SXT
		Pneumokoky	≥19	≤10	
VAN	Vankomycin	Stafylokoky	≥12	≤9	VA
		Enterokoky	≥17	≤14	
NOR	Norfloxacin 5μg		>17		<12
FUR	Nitrofurantoin 300μg		>17		<14

Zdroj: MUDr. R.Kramář (2007): Interpretace průměrů inhibičních zón, Instrukce 10 – B1, mikrobiologická laboratoř Laboma a.s., 1s.

3.3.8.2. Stanovení citlivosti na ATB kvantitativním způsobem

Ke stanovení citlivosti na ATB kvantitativním způsobem patří diluční metody, kterými se dá zjistit minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC je nejnižší koncentrace ATB, kterou se dá potlačit růst mikroba. Udává se v mg/l. Pro takto

vyšetřovanou citlivost kmene na ATB je důležité mít kmen izolován z krve. Ke stanovení MIC se používají sérologické mikrodestičky naplněné médiem obsahujícím vzestupnou koncentraci vhodných ATB. Do důlků mikrodestiček se jehlovým inokulátorem naočkuje naředěná suspenze bujonové kultury. Standardně následující den se odečítá, zda bujon v důlcích zůstal čirý nebo zda došlo k jeho zbarvení. Pokud se důlek zbarvil, dochází v něm k růstu mikroba a příslušná koncentrace ATB je pro léčení nepřijatelná. Stejným způsobem se dá také stanovit MBC, což je minimální baktericidní koncentrace. Tato hodnota vyjadřuje nejnižší koncentraci ATB, která je ještě schopna mikroba usmrtit. Stanovení hodnoty MIC se dá ještě jednoduchým, ale nákladnějším testem. Jde o švédský E-test. Jedná se o proužek napuštěný antimikrobiální látkou v zestupné koncentraci. Proužek se položí na plotnu, která je naočkovaná stejným způsobem jako na diskový difusní test. Proužek je opatřený vyznačenými hodnotami. Tam, kde protíná okraj inhibiční zóny okraj proužku, se odečte hodnota MIC. ⁽²⁹⁾

3.3.9. Celý kultivační proces diagnostiky *Bordetelly pertussis* a *Bordetelly parapertussis* prováděný v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o.

Diagnostiku *Bordetella pertussis* a *B. parapertussis* jsem prováděla v českobudějovické mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o, řídila jsme se tedy jejich zavedenými pravidly. Některá z nich mohou být v jiné laboratoři do jisté míry odlišná.

Materiál, nejčastěji v plastových uzavíratelných pouzdrech, přichází do laboratoře v dopoledních hodinách. Zaslaný materiál na odběrovém tamponu zanořeném v transportním mediu musí být opatřen štítkem, kde je pacientovo celé jméno a případně rodné číslo. Spolu se vzorkem by měla být doručena také žádanka, na které jsou uvedeny údaje o pacientovi (jméno, příjmení, rodné číslo, pojišťovna atd.) a lékařem požadované vyšetření.

Zkontrolovala jsem údaje na materiálu a na přiložené žádance. Informace se shodovaly, proto jsem mohla přiřadit materiálu a žádance požadované číslo. Materiál a žádanka musí mít stejné číslo. Pokud se údaje neshodují, kontaktuje laborantka příslušného lékaře, od kterého byl materiál poslán. Pokud je materiál poškozen, např. je

zaslán jen výtěrový tampon nebo transportní médium, musí laborantka kontaktovat lékaře, od kterého vzorek přišel, a požadovat nové zaslání materiálu. Pokud je vše v pořádku, zaregistruje laborantka pacienta a zapíše potřebné údaje do počítače.

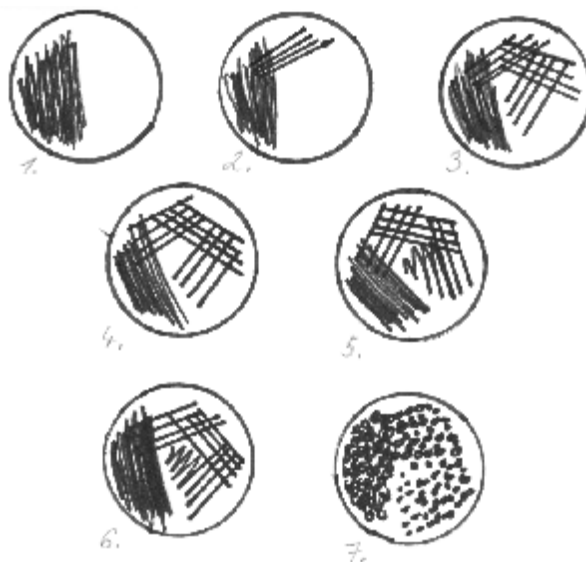
Samotná manipulace se vzorkem musí být prováděna za aseptických podmínek a laborant by se měl chránit ochrannými pomůckami. V laboratoři jsme si připravila půdy, na které budu materiál očkovat. Jde o půdu KA, který je vhodný pro odlišení od haemofilů (gram – negativní kokobacil až štíhlé tyčky až štíhlá tyčka). Po naočkování krevního agaru je nutné na něm udělat stafylokokovou čáru, která zachytí růst haemofila. Na KA nevyrostá *B. pertussis*, protože je růstově náročná a velmi citlivá. Na KA zachytíme *B. parapertussis*, která nemá tak náročné růstové požadavky a díky stafylokokové čáře zachytíme také růst haemophilla, který kolem ní vyrůstá. Dále použijeme půdu pro kultivaci *B. pertussis* a tou je charcoal agar (Regan-Lowe agar DULAB Kat č.237) s cefalexinem, označenou RLE+, nebo bez cefalexinu, označenou RLE-.⁽⁹⁾

Na jednotlivé půdy jsem napsala číslo vzorku. Číslo vždy píšeme na spodní část Petriho misky. Má to velmi důležitý význam. Neopatrností může dojít k záměně horních víček, a tak by každý vzorek dostal jiné identifikační číslo. Pokud je Petriho miska popsána zespoda, tak nemůže dojít k záměně materiálu. Číslo jsem psala čitelně tmavou fixou, pokud se jedná o KA, který má červenou barvu, a bílou tužkou, pokud se jedná půdu Regan-Lowe, která má hnědou a černou barvu. Identifikační čísla na půdách pěkně vyniknou. Pokud přišlo více materiálů *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*, můžeme půdy zespod misky, fixou nebo tužkou, rozdělit na dva, tři či čtyři díly a provést očkování do každého dílu jiným vzorkem. Každý díl musíme opatřit identifikačním číslem. Očkováním až 4 materiálů do jedné půdy se snižují náklady laboratoře. Pokud dojde v určitém dílu k nárůstu bakterie, můžeme kolonie rozočkovat na samostatnou plotnu.

Po řádném označení plotny jsem, přešla k samotné kultivaci. Výtěrový tampon jsme otevřela a vyjmula z ní odběrový tampon. Odběrový tampon s transportním médiem jsem vložila do stojánku. Připravila jsem jednu z půd a výtěrovým tamponkem vytvořila inokulum, což je masivně naočkovaná asi ¼ půdy. Po vytvoření inokula jsem vložila

výtěrový tampon zpět do transportního média a sterilní bakteriální kličkou vytvořila 4 čáry z inokula do volné části plotny. Kličku jsem poté vyžihala v plameni kahanu. Vyžiháním v plameni dojde ke zničení zanechaného materiálu na kličce. Pokud pracujeme s plastovou kličkou na jedno použití, pak další postup provádíme s novou. Misku jsem pootočila asi o 60° a totéž opakovala s novou nebo čistou bakteriální kličkou ještě třikrát. Konečné 4 čáry se dělat nemusejí a může se místo nich použít „hadové“ rozočkování, které jsem používala v tomto případě. Výše popsany postup kultivace jsem provedla na všech zvolených půdách. Na půdy pokládáme antibiotický cefalosporinový disk, který potlačuje růst ostatních bakterií. Bordetelly rostou až k cefalosporinovému disku. Na krevní agar (KA) jsem naočkovala navíc stafylokokovou čáru, která slouží k záchytu *haemophilla influenzae a parainfluenze*. V tomto případě využíváme tzv. satelitového fenoménu, což je schopnost haemophilů růst v okolí kolonie *Staphylococca aurea*. Pokud máme více materiálů a plotny jsme si rozdělili na části, vytváříme na jednotlivých dílech pouze inokulum a položíme do nich cefalosporinové disky. Pro lepší představu principu vedení čar na půdách viz Obrazová příloha č.1 níže.

Obrazová příloha č.1. : Princip vedení čar při očkování půd



Obrazová příloha: Vlastní

Na prvním obrázku v Obrazové příloze č. 1 je vytvořené inokulum, na druhém obrázku je patrné první čárové rozočkování vedené z inokula, na třetím obrázku jsou znázorněny další dva kroky rozočkování bakterie. Obrázek 4 znázorňuje, jak má vypadat naočkovaná půda a obrázek 5 znázorňuje další možnost zakončení naočkované půdy tzv.: „hádkiem“. Obrázek 6 znázorňuje naočkovanou půdu před nárůstem bakterie a na obrázku 7 je patrný nárůst kolonií na půdě.

Naočkované půdy jsem ke kultivaci vkládala do termostatu vždy víčky dolů, aby se na plotně neusazovala kondenzní voda. Umístila jsem je do plastové krabičky, do které jsem spolu s nimi vložila sputovku, která obsahovala vatu namočenou ve vodě. Tímto postupem se vytvořilo vlhčí prostředí, které se pro kultivaci bordetel osvědčilo. Půdy na bordetelly inkubujeme 7 dní při 37–35°C a denně odečítáme. *Bordetella parapertussis* mohou být patrné už za 2–4 dny od kultivace na rozdíl od *Bordetella pertussis*, která se projevuje nejdříve za 5 dní od kultivace. Pokud inkubujeme plotny, na které jsme kultivovali více pacientů, a je v určitém dílku patrný nárůst, je nutné kolonie přeočkovat. Přeočkování provádíme na celou plotnu klasickým způsobem, a to pomocí čar vedených z inokula. Získáme tím čistší kolonie a můžeme pozorovat lépe hemolýzu kolem jednotlivých kolonií.

U narostlých půd Regan-Lowe jsou patrné, v případě *Bordetella parapertussis*, kolonie šedostříbrné, lesklé, kulovité. Pokud se jedná o *Bordetella pertussis* kolonie se jeví jako průhledné s perleťovým leskem a kulovité.

Nárůst na krevním agaru pozorujeme jako šedostříbrné kolonie, které tvoří tmavou hnědou až černou pigmentaci. Kolem jednotlivých kolonií je také patrné nažloutlé až průhledné projasnění, jedná se o beta-hemolýzu. Na KA mohou také vyrůst bakterie, které se nacházejí v normální flóře respiračního ústrojí. Na krevním agaru pravděpodobně může vyrůst *haemophilus influenzae*. Využívá se jeho schopnosti růst na krevním agaru v okolí *Staphylococcus aureus*.

Dalším ukazatelem, zda jde o *Bordetella pertussis* a *parapertussis*, je test na ureázu a oxidázu. V laboratoři „Laboma“ se k provedení oxidázového testu používají proužky od

firmy TESTline (CYTOCHROMOXIDÁZA OXI STRIP TESTline Kat.č.Ox0100). V balení je 100 kusů proužků, které při správném skladování (v suchu při +2 až +8°C) mají expirační dobu 24 měsíců od data výroby. Test slouží k průkazu přítomnosti cytochromoxidázové aktivity mikroorganismů. Plastové proužky obsahují papírovou zónu prosycenou roztokem N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu s α -naftolem.(32) Papírovou zónou jsem otiskla kolonii z čisté kultivace a po 1 minutě odečetla výsledek. Pokud nanese kolonii bakteriální kličkou, používáme plastovou na jedno použití. Změní-li se v místě nanesené kolonie barva papírku na tmavěmodrou až černou, uvádíme výsledek jako pozitivní.

K provedení ureázového testu se používají v laboratoři „Laboma“ diagnostické disky od firmy ITEST plus (UREA ITEST Kat.č.DD511). Disky se prodávají po 50 kusech a skladují se v temnu a suchu při +2 až +8°C. Disky jsou určeny pro detekci enzymu ureázy. (33) Test na ureázu je svým provedením složitější než předchozí test. Nejprve jsem si musela vytvořit suspenzi z testovaného kmene. Pro vytvoření požadované suspenze jsem postupovala následovně: do zkumavky jsem naměřila 0,4 ml destilované vody, kličkou odebrala kolonie a vytřepala je do destilované vody. Do připravené hustší suspenze (3 stupeň McFarlandovy zákalové stupnice) jsem vložila jeden diagnostický disk a inkubovala při 37°C tři hodiny. Poté jsem odečetla. V pozitivním případě změnila suspenze barvu na růžovou, v případě negativní reakce se změnila barva suspenze na žlutou.

Pro ověření, zda se jedná skutečně o bordetelly, použijeme sklíčkovou aglutinaci séry anti *B. pertussis* (Agglutinační sérum Bordetella pertussis REMEL Kat.č.R30165501) a anti *B. parapertussis* (Agglutinační sérum Bordetelly parapertussis REMEL Kat.č.R30165601).

Na čisté a odmaštěné sklíčko jsem nakapala sérum anti *B. pertussis*, kličkou nabrala jednu kolonii z čisté kultury a rozetřela v kapce séra. Čistá kultura je kultura jednoho druhu bakterií. V kapce séra jsem pozorovala, zda došlo k aglutinaci. Aglutinace se vytvořila a vzorek se může pokládat za pozitivní na *B. pertussis*. Stejný postup jsem prováděla s *Bordetella pertussis* i v antiséru *B. parapertussis*. V tomto případě se

aglutinace nevytvořila. Celý postup jsem provedla také s *Bordetella paraptussis*. Aglutinace byla patrná u antiséra *Bordetella paraptussis*.

Dále jsem chtěla zjistit, jak jsou bakterie velké a jaký mají tvar. Udělala jsem proto nátěr a barvila ho podle Grama. V mikrobiologické laboratoři „Laboma“ jsem při přípravě barevných nátěrů podle Grama postupovala následovně:

1. Na čisté sklíčko jsem napsala tmavou fixou číslo vzorku. Číslo jsem napsala na zadní stranu sklíčka, protože by se při barvení mohlo na přední straně smýt.
 2. Na popsané sklíčko jsem zhotovila nátěr. Pomocí bakteriologické kličky jsem přenesla z plotny na sklíčko kolonie mikroba, které jsem kličkou rozetřela v kapce vody.
 3. Zaschlý preparát jsem fixovala plamenem. Sklíčko jsem 3x protáhla plamenem. Držela jsem ho nátěrem nahoru a v šikmé poloze, aby plamen přirozeně odtékal po spodní straně sklíčka směrem od prstů ruky nahoru. Po správné fixaci bychom měli bez popálení kůže udržet sklíčko na hřbetu ruky.
 4. Sklíčko jsem položila do vodorovné polohy a pokryla roztokem krystalové violeti a nechala 1 minutu působit.
 5. Po 1 minutě jsem do krystalové violeti přilila Lugolův roztok a nechala opět 1 minutu působit.
 6. Po 1 minutě jsem barvivo oplachovala acetonem až po dobu odtékání modré barvy.
 7. Po oplachu jsem preparát dobarvila ředěným karbolfuchsinem a omyla vodou.
 8. Preparát jsem osušila a prohlížela při imerzním zvětšení 1000x.⁽¹⁵⁾
- V mikroskopu jsem pozorovala červené gram-negativní kokobacily.

Pozitivní nálezy *Bordetella pertussis* a *Bordetella paraptussis* je nutné telefonicky hlásit na Epidemiologické oddělení KHS a také ošetřujícímu lékaři. Pozitivní kmeny na *Bordetella pertussis* a *Bordetella paraptussis* můžeme hlásit Státnímu zdravotnickému ústavu na NRL pro pertusi a paraptusi, kde vystavují kmeny dalším testům a hodnotí, zda nedochází k jejich vývoji a ke změnám.

Pokud chceme vědět, na která ATB jsou *Bordetella pertussis* a *Bordetella paraptussis* citlivá nebo rezistentní, provedeme jednoduchou metodu o průkazu citlivosti mikroba na ATB. Jedná se o kvalitativní diskovou metodu. Ke stanovení

citlivosti jsem si připravila půdy Regan-Lowe pro růst *Bordetella pertussis* a KA, na kterém vyrůstá *Bordetella parapertussis*. Dále jsem si připravila suspenzi (0,5 stupňů McFarlandova zákalového standardu) z čisté kolonie. Suspenzi jsem vytvořila následujícím postupem: sterilní nebo vyžíhanou kličkou jsem nabrala kolonii z plotny, vytřepala do 0,2 ml fyziologického roztoku a na třepačce a na Densilometru, který určí stupeň McFarlanda. Připravenou suspenzi jsem přelila přes půdu a přebytek suspenze jsem odsála pasteuovou pipetou. Misku jsem naklopila a přebytek odsála. Po zaschnutí plotny jsem položila disky ve směru hodinových ručiček pomocí jehly. Zvolila jsem antibiotické disky: ampicilin, amoxicilin s inhibítorem, azitromycin, cefuroxim, cotrimoxazol. Naočkované půdy jsem dala kultivovat do termostatu ve vlhké komůrce dnem vzhůru. Kultivace probíhala při 37°C. Po nárůstu půd jsem odečítala citlivosti. Hodnotila jsem průměry vytvořených inhibičních zón kolem ATB disků a odečítala pomocí posuvného měřítka. Po stanovení citlivosti byla *Bordetella pertussis* citlivá na ampicilin, amoxicilin s inhibítorem, azitromycin, cefuroxim a rezistentní na cotrimoxazol. *Bordetella parapertussis* je citlivá na ampicilin, amoxicilin s inhibítorem, azitromycin a rezistentní na cefuroxim a na cotrimoxazol.

3.4. Sérologická diagnostika

Sérologická diagnostika patří mezi nepřímý průkaz bakterie. U sérologického průkazu *Bordetella pertussis* vyšetřujeme protilátky proti pertusi v séru aglutinační metodou. Tuto metodu může použít v případě průkazu akutního onemocnění nebo k průkazu přetrvávajících protilátek po očkování celobuněčnou vakcínou proti pertusi.⁽¹⁴⁾

Pro provedení diagnostiky je nutné mít dva vzorky sér. První vzorek je odebrán co nejdříve při prvním podezření na onemocnění pertusí. Druhý vzorek je odebrán za 2–4 týdny. V tomto intervalu je nejlépe patrný čtyřnásobný vzestup nebo pokles protilátek. Séra jsou vyšetřována nejlépe současně ve stejné laboratoři. V dnešní době jsou na trhu dostupné aglutinogeny na *B. pertussis* od firmy GALI s.r.o., aglutinogeny na *B. parapertussis* nejsou k dispozici. Vyšetření aglutinační metodou není vhodné pro stanovení postvakcinační imunity u dětí, které jsou primárně očkované a přeočkované

acelulární očkovací látkou proti pertusi. Za těchto podmínek se provádí vyšetření na IgG protilátek proti pertusovému toxinu. Jedná se o metodu ELISA. Vyšetření můžeme používat k rozlišení infekce a postvakcinační reakce. Po očkování se totiž netvoří protilátky IgA. Tvoří se pouze v prvotní fázi infekce a netvoří se u kojenců do 3 měsíců. Stanovení protilátek IgM je vhodné u dětí mladších 6 let. Po vakcinaci se prokazatelně tvoří protilátky IgM a IgG. Pro provedení metody je důležité mít dva vzorky séra. Pokud použijeme k reakci kombinované sety, což jsou sety s pertusovým toxinem a filamentózním hemaglutinem, může nastat riziko zkřížené reakce *B. pertussis* a *B. parapertussis*. Ke zkřížené reakci dochází, protože *B. parapertussis* obsahuje filamentózní hemaglutin jako *B. pertussis*. Dále může být zkřížená reakce s *H. influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamidia pneumoniae*. Při podezření na tuto reakci je nutné vyšetřit protilátky IgG proti pertusovému toxinu. ⁽¹⁴⁾

Další rychlou metodou je metoda PCR. Pozitivní výsledky zobrazuje i při léčbě antibiotiky, ale vyšlá pozitivita by měla být vždy potvrzena dalším vyšetřením. Současně se rutinně nepoužívá. ⁽¹⁴⁾

3.4.1. Stručný popis vyšetření IgG protilátek toxinu *Bordetella pertussis* v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o.

1. Připravíme si plastový rámeček, do kterého umístíme požadovaný počet jamek, a pipetovací protokol.

2. Do příslušných jamek mikrotitračního pásku přidáme 100 mikrolitrů naředěného vzorku a kontrolní séra připravená k použití. Jednu jamku necháme volnou pro holý substrát (blank).

Např.: A1 blank

B1 negativní kontrolní sérum

C1 standardní sérum

D1 standardní sérum

E1 pacient 1 atd.

3. Necháme vzorek inkubovat 60 minut při 37°C ve zvlhčovací komoře.

4. Po inkubaci promyjeme 4x jamku destilovanou vodou.

5. Přidáme 100 mikrolitrů konjugátu Ig připraveného k použití do příslušné jamky (s výjimkou jamky pro holý substrát).
6. Inkubujeme 30 minut při 37°C ve zvlhčovací komoře.
7. Po inkubaci promyjeme 4x jamku destilovanou vodou.
8. Přidáme 100 mikrolitrů připraveného roztoku substrátu do každé jamky (včetně jamky pro holý substrát).
9. Inkubujeme 30 minut při 37°C ve zvlhčovací komoře.
10. Přidáme 100 mikrolitrů zastavovacího roztoku do každé jamky a jemně protřepeme.
11. Odečteme.

3.4.2. Porovnání sérologie a kultivace

Kultivační metody je dobré provádět v katarální fázi. S pokračujícím onemocněním klesá také kultivační pravděpodobnost záchytu bakterie. V prvním fázi onemocnění se využívá toho, že organismus obsahuje hodně bakterií a méně protilátek. Protilátky v průběhu onemocnění stoupají. Protilátky IgM mají rychlý vzestup, postupně klesají a tvoří se protilátky IgG, které se tvoří po očkování nebo po prodělaném onemocnění.

U jedinců, kteří podstoupili v minulosti očkování, je hodnocení sérologie obtížné.

Metodu ELISA je nezbytné provádět ze dvou vzorků séra, a to s odstupem tří týdnů. Oba dva vzorky je dobré vyšetřit v jedné laboratoři. První vzorek by měl být odebrán co nejdříve od začátku obtíží. Problémem sérologie je, že protilátky proti pertusovému toxinu jednoznačně od sebe neodliší stav po očkování a po prodělané infekci. Kultivační vyšetření může být negativní u osob, které byly očkovány nebo u nich byla zahájena antibiotická léčba a záchvaty kašle po více jak třech týdnech trvají. Pokud je kultivace negativní, neznamená to vyloučení onemocnění. ^(2,3)

V mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. se všechny zaslané vzorky vyšetřovaly, na *Bordetella pertussis* a *parapertussis* kultivačními metodami.

3.5. Dotazník

Dotazník je určený praktickým lékařům pro děti a dorost a praktickým lékařům pro dospělé. S dotazníkem se setkala 28 respondentů. Z toho bylo zhodnoceno 20 řádně vyplněných dotazníků. V dotazníku byly položeny následující otázky:

- 1. Setkali jste se v posledních 3 letech s klinicky nemocným pertusí?*
- 2. Onemocnění se nejčastěji vyskytovalo v těchto věkových kategoriích:*
- 3. V jakém nebo v jakých ročních obdobích se onemocnění vyskytlo?*
- 4. Nakazil se pacient prokazatelně od rodinných příslušníků?*
- 5. Z jaké spádové oblasti pacient pocházel?*
- 6. Kolik vašich pacientů muselo být hospitalizováno?*
- 7. Došlo mezi vašimi pacienty k úmrtí na pertusi?*
- 8. Diagnózu stanovují převážně:*
- 9. Jaká antibiotika k léčbě přednostně volíte?*
- 10. Myslíte, že je vhodné zavést plošné přeočkování pacientů určitých věkových skupin?*

4. Výsledky

4.1. Rozlišení *B. pertussis* a *B. parapertussis*

Tabulka č. 1: Rozlišení *B. pertussis* a *B. parapertussis*

Název bakterie	KA krevní agar	Regan-Löwe agar	Vzhled kolonií	Pigmentace	Hemolýza	Aglutinace pertussis	Aglutinace para-pertussis	Ureáza	Oxidáza
<i>Bordetella pertussis</i>	-	+	Průhlednější bílé, lesklé	-	-	+++	-	-	+
<i>Bordetella parapertussis</i>	+	+	Porcelánově bílé, lesklé	+	+	-	+++	+	-

Zdroj: Vlastní výzkum

Podle Tabulky č.1 je dobře patrné rozlišení *B. pertussis* od *B. parapertussis*. Informace jsem zjistila podle kultivačních výsledků, aglutinačních výsledků a podle dvou testů na ureázovou a na oxidázovou reakci.

Při kultivaci jsem se přesvědčila, že *B. pertussis* opravdu neroste na KA na rozdíl od méně citlivé *B. parapertussis*, která zde vyrůstá už po 2. dni kultivace. Na půdě Regan-Lowe vyrůstají obě bakterie, ale jejich růst se liší časově. *B. pertussis* je náročnější, proto vyrůstá za 3 a více dní. Hemolýzu tvoří *B. parapertussis*, u které je také patrná tmavá pigmentace kolem kolonií. Kolonie se mi zdály téměř porcelánově bílé s lesklým povrchem a u *B.pertussis* jsou bílé s perleťovým leskem. U některých kolonií byl vzhled bakterie lépe od sebe odlišitelný než u kolonií jiného vzorku, kde byl nárůst menší.

U sklíčkové aglutinace reaguje *B. pertussis* se sérem *B.pertussis* a *B. parapertussis* se sérem *B. parapertussis*. Když se jednalo o *Bordetella pertussis*, tvořila aglutinaci se sérem *B. pertussis*, a pokud se jednalo o *Bordetella parapertussis*, aglutinace se vytvořila v séru *B. parapertussis*. V každém z případů byla aglutinace dobře patrná.

Poslední dva sloupce v tabulce hodnotí, která z bakterií má pozitivní ureázu a která oxidázovou reakci. Urea test je pozitivní u bakterie *B. parapertussis* a test na oxidázu je pozitivní u bakterie *B. pertussis*.

Tabulka č. 2. : Časová náročnost růstu *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*

Název bakterie	Doba prvních příznaků růstu
<i>Bordetella parapertussis</i>	48 – 72 hodin
<i>Bordetella petrusis</i>	144 – 168 hodin

Zdroj: Vlastní výzkum

Podle tabulky je patrný časový rozdíl v nárůstu bakterie *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*. Jelikož je *Bordetella parapertussis* méně citlivá a méně náročná než *Bordetella pertussis*, jsou její první příznaky růstu na KA patrné už po uplynutí 48 hodin. U některé jsem pozorovala narůst po uplynutí delšího časového intervalu. U *Bordetella pertussis* byly první příznaky patrné po uplynutí 144 hodin, ale byly minimálně pozorovatelné. Lépe pozorovatelné byly po uplynutí 168 hodin.

Tabulka č.3 : Citlivost *Bordetella pertussis* a *parapertussis* na ATB

Název bakterie	ampicilin	amoxicilin s inhibítorem	azitromycin	cefuroxim	cotrimoxazol
<i>Bordetella pertussis</i>	C	C	C	C	R
<i>Bordetella parapertussis</i>	C	C	C	R	R

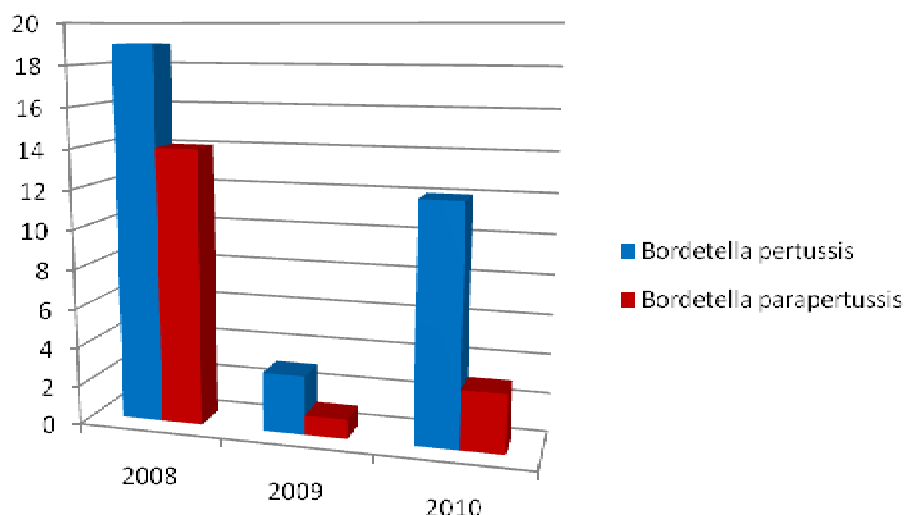
Zdroj: Vlastní výzkum

Podle tabulky je *Bordetella pertussis* citlivá na ampicilin, amoxicilin s inhibítoem, azitromycin, cefuroxim a rezistentní na cotrimoxazol. *Bordetella parapertussis* je citlivá na ampicilin, amoxicilin s inhibítoem, azitromycin a rezistentní na cefuroxim a na cotrimoxazol.

4.2. Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. za poslední 3 roky

srovnávací grafy: *Bordetella pertussis* – *Bordetella parapertussis*

Graf 1: Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* za poslední 3 roky

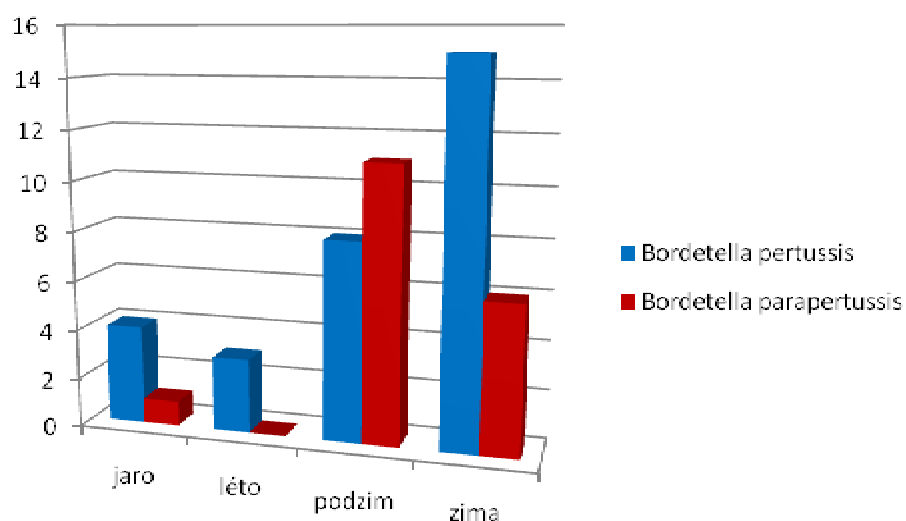


Zdroj: Vlastní výzkum

Celkem se v roce 2008–2010 vyskytlo v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. 34 případů pertuse a 18 případů parpaertuse. V mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. bylo v roce 2008 nejvíce pozitivních materiálů na *Bordetella pertussis* a na *Bordetella parapertussis*. Celkem se v tomto roce vyskytlo 19 případů pertuse a 14 případů parpaertuse. Nejmenší výskyt pertuse (3 případy) a parpaertuse (1 případ) byl v roce

2009. V roce 2010 byl zaznamenán nárůst *B. pertussis* na 12 případů a *B. parapertussis* na 3 případy.

Graf 2: Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* v roce 2008–2010 podle ročního období



Zdroj: Vlastní výzkum

Podle grafu je patrné, že *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* se nejvíce vyskytla za poslední 3 roky na podzim a v zimě. Na podzim bylo zaznamenáno v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. 8 případů pertuse a 11 případů parapertuse. Další nárůst je pozorovatelný na jaře, kdy byly 4 případy pertuse a 1 případ parapertuse. Nejmenší výskyt *Bordetella pertussis* (3 případy) a *Bordetella parapertussis* (nulový výskyt) byl pozorovaný v létě. V každém roce se nejčastěji vyskytovaly bakterie v zimě a na podzim.

Tabulka č. 4 : Rozepsaný výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* podle měsíců v ročním období

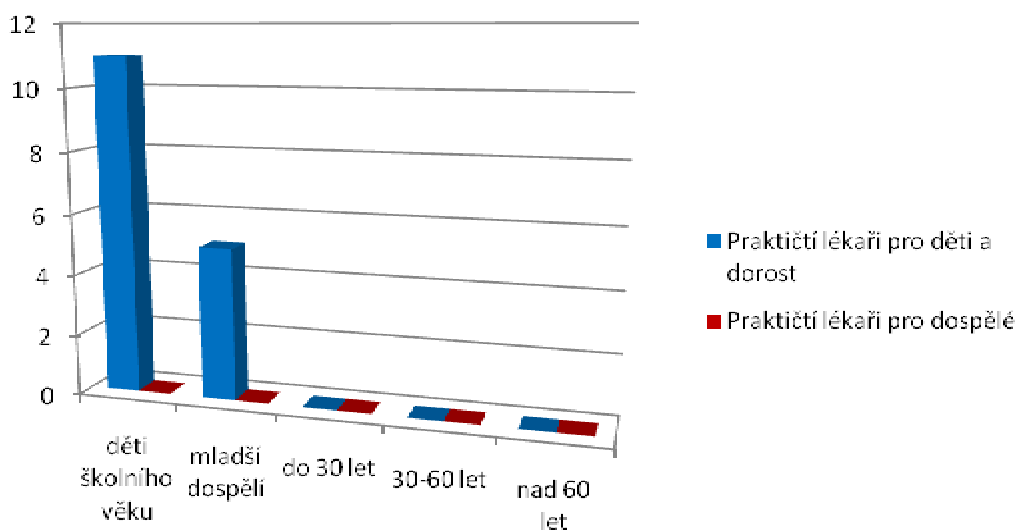
Měsíc v roce	Výskyt	Výskyt
	Bordetella pertussis	Bordetella parapertussis
leden	7	0
únor	3	0
březen	0	1
duben	3	0
květen	0	0
červen	3	0
červenec	2	0
srpen	1	0
září	1	1
říjen	2	3
listopad	7	7
prosinec	5	6

Zdroj: Vlastní výzkum

Největší výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* za uplynulé 3 roky v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. byl v měsíci listopadu a v měsíci prosinci. *Bordetella parapertussis* se vyskytla pouze v měsících březen, září, říjen, listopad, prosinec. Nulový výskyt pertuse byl zaznamenán v měsících květen a březen. V roce 2010 se *Bordetella pertussis* vyskytla v měsících leden (7 případů), únor (3 případy), říjen (2 případy) a *Bordetella parapertussis* se vyskytla v měsících říjen (3 případy). V roce 2009 se pertuse vyskytla v měsících prosinec, srpen, duben a parapertuse se vyskytla v březnu. V roce 2008 se *Bordetella pertussis* vyskytla v měsících prosinec (4 případy), listopad (7 případů), září (1 případ), červenec (2 případy), červen (3 případy),

duben (2 případy) a *Bordetella parapertussis* se vyskytla v prosinci (6 případů), listopadu (7 případů), září (1 případ).

Graf 3: Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* v roce 2008–2010 podle věkových skupin

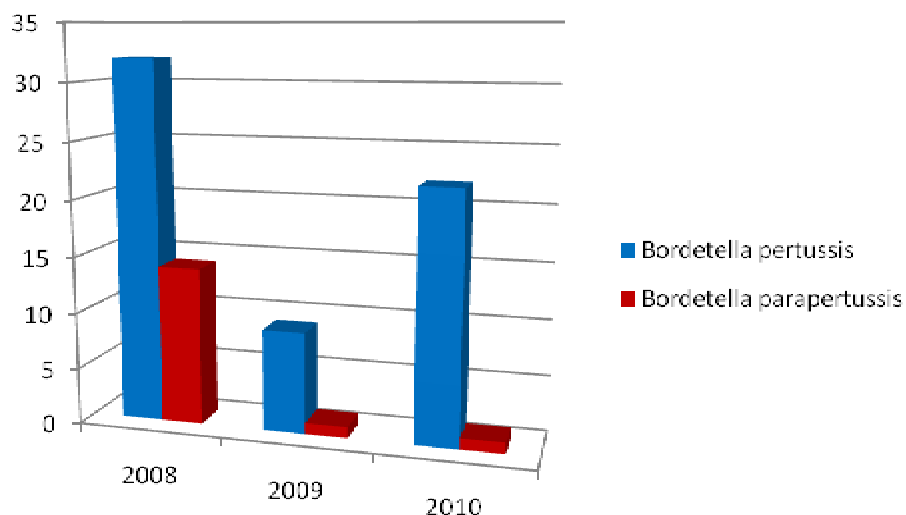


Zdroj: Vlastní výzkum

Za uplynulé 3 roky byly v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. shledány vzorky pozitivní na *Bordetella pertussis* nejvíce z věkové skupiny 10–14 let a z věkové skupiny 15–19 let. *Bordetella parapertussis* měla podle grafu větší výskyt ve věkových skupinách 10–14 let a ve skupině 4–9 let. *Bordetella pertussis* se v roce 2008–2010 vyskytla ve skupině 15–20 let (14 případů), ve skupině 10–14 let (15 případů), ve skupině 4–9 let (2 případy) a ve skupině nad 20 let (1 případ). *Bordetella parapertussis* se v uplynulých 3 letech vyskytla ve skupině 15–19 let (3 případy), ve skupině 10–14 let (8 případů), ve skupině 4–9 let (5 případů) a ve skupině nad 20 let (1 případ).

4.3. Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* na Jindřichohradecku za poslední 3 roky

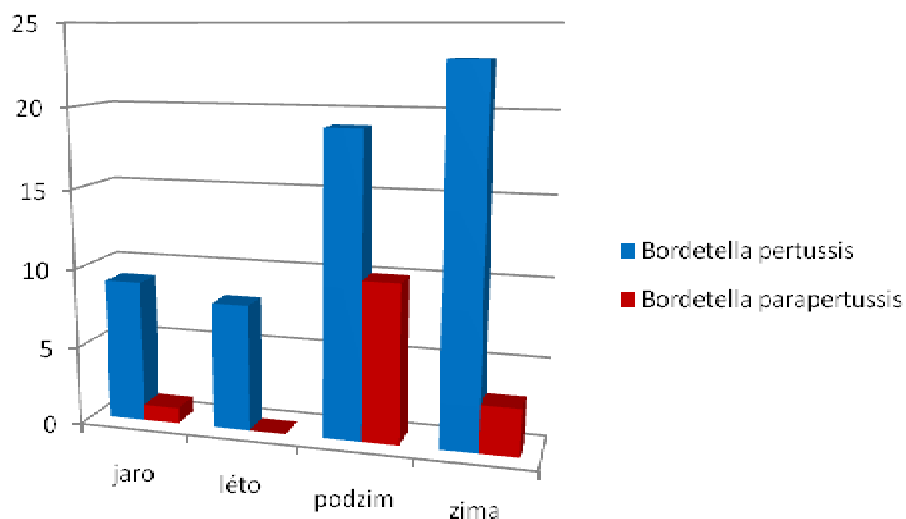
Graf 4: Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* za poslední 3 roky



Zdroj: Vlastní výzkum

Celkem bylo v roce 2008–2010 na Jindřichohradecku hlášeno 63 případů pertuse a 14 případů parapertuse. V roce 2008 bylo zaznamenáno 22 případů pertuse a 12 případů parapertuse. Rok 2008 byl rok s největším výskytem těchto dvou bordetell. Nejméně pertuse a parapertuse bylo hlášeno v roce 2009. V tomto roce se na Jindřichohradecku vyskytlo 9 případů pertuse a 1 případ parapertuse. V roce 2010 byl zaznamenán nárůst *Bordetella pertussis* (22 případů) a stálost *Bordetella parapertussis* (1 případ).

Graf 5: Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* v roce 2008–2010 podle ročního období



Zdroj: Vlastní výzkum

Na Jindřichohradecku byly zaznamenány první příznaky pertuse a parapaertuse nejvíce v zimě a na podzim. V zimě pocítilo první příznaky nakažení pertusí 23 pacientů a 3 pacienti infikovaní parapertusí. Na podzim byly první příznaky nakažení *Bordetella pertussis* hlášené u 17 případů a u 10 případů nakažených *Bordetella parapertussis*. Výskyt 19 případů *Bordetella pertussis* a 1 případu *Bordetella parapertussis* byl hlášen na jaře. Nejmenší výskyt pertusí (8 případů) a žádný výskyt parapertuse byl hlášen v létě. V každém roce se nejčastěji vyskytovaly bakterie v zimě a na podzim.

Tabulka č. 5 : Rozepsaný výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* podle měsíců v ročním období

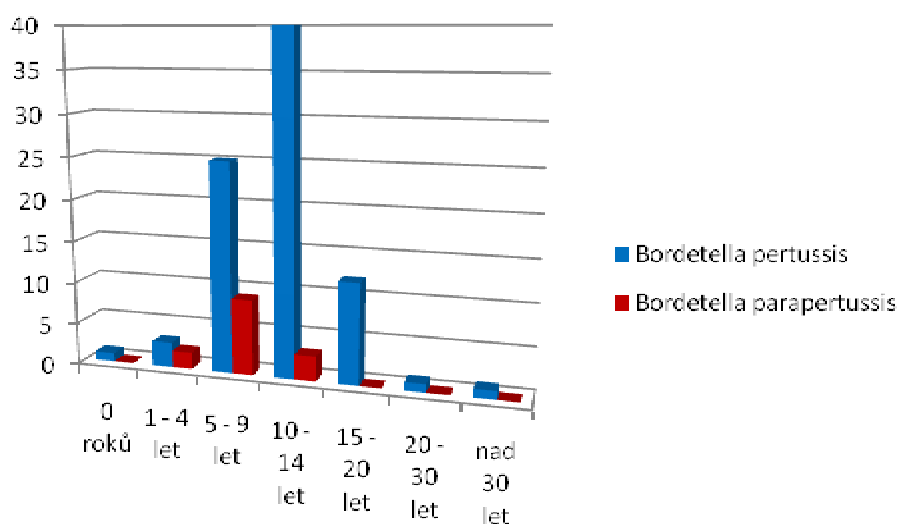
Měsíc v roce	Výskyt <i>Bordetella pertussis</i>	Výskyt <i>Bordetella parapertussis</i>
leden	18	0
únor	2	0
březen	6	1
duben	4	0
květen	1	0
červen	4	0
červenec	3	0
srpen	1	0
září	3	1
říjen	2	3
listopad	13	6
prosinec	6	3

Zdroj: Vlastní výzkum

Největší výskyt *Bordetella pertussis* za uplynulé 3 roky na Jindřichohradecku byl zaznamenán v měsíci lednu, prosinci a listopadu. Největší výskyt *Bordetella parapertussis* za uplynulé 3 roky na Jindřichohradecku byl zaznamenán v měsíci listopadu a prosinci. *Bordetella parapertussis* se vyskytla pouze v měsících březnu, září, říjnu, listopadu, prosinci. V roce 2008 byla pertuse zaznamenána v listopadu (12 případů), v březnu (4 případy), v červnu (4 případy), v dubnu (3 případy), v červenci (2 případy), v září (2 případy) a po jednom případě v lednu, únoru, květnu, srpnu, říjnu. Ve stejném roce byla zaznamenána parapertuse v listopadu (6 případů), v říjnu (3 případy) a prosinci (3 případy). V roce 2009 byly první příznaky výskytu pertuse zaznamenány

po dvou případech v lednu, v listopadu a po jednom případě v březnu, v dubnu, v červenci, v říjnu, v prosinci. U parpaertuse byly první příznaky u jednoho případu zaznamenány v březnu. V roce 2010 byly první příznaky výskytu *Bordetella pertussis* zaznamenány v lednu (13 případů), v prosinci (5 případů) a po jednom případě v únoru, březnu, září, listopadu. První příznaky *Bordetella parapertussis* v roce 2010 byly zaznamenány v měsíci listopadu, a to u jednoho případu.

Graf 6: Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* v roce 2008–2010 podle věkových skupin



Zdroj: Vlastní výzkum

V roce 2008–2010 se onemocnění *Bordetella pertussis* vyskytlo nejvíce ve věkové skupině 10–14 let a ve věkové skupině 5–9 let. U *Bordetella parapertussis* byl zaznamenán největší výskyt ve věkové skupině 5–9 let a 10–14 let. V uplynulých 3 letech byl výskyt pertuse zaznamenán v těchto věkových skupinách: ve věkové skupině 10–14 let (40 případů), 5–9 let (25 případů), 15–20 let (12 případů), 1–4 roky (1 případ), 20–30 let (1 případ), ve věkové skupině nad 30 let (1 případ) a ve věkové skupině 0 roků (1 případ). Pacient z poslední věkové skupiny musel být hospitalizován,

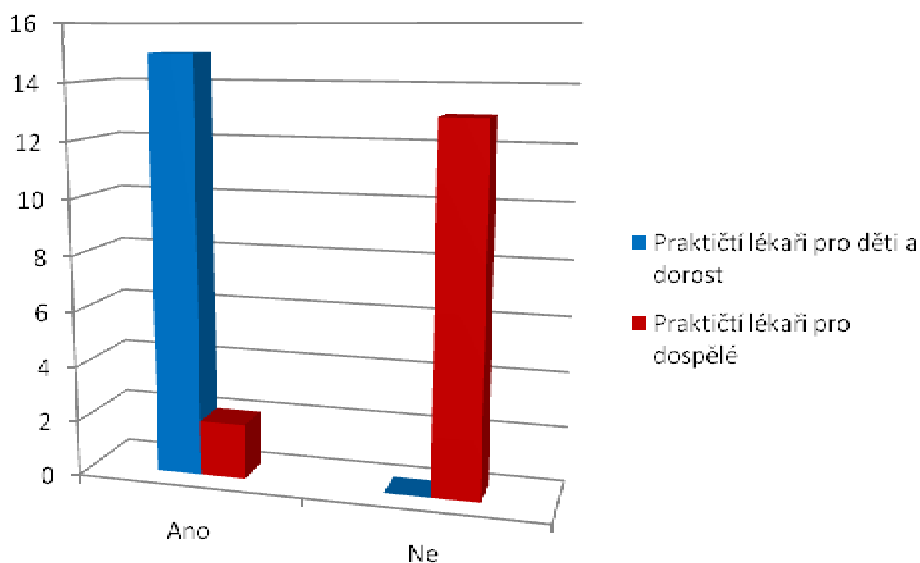
protože šlo o dosud neočkovaného jedince. U parpaertuse byl hlášen výskyt u těchto věkových skupin: u věkové skupiny 5–9 let (9. případů), 10–14 let (3 případy) a 1–4 let (2. případy).

4.4. Zpracování vyplněných dotazníků od praktických lékařů z Jindřichova Hradce a okolí

Srovnávací grafy: ordinace lékaře pro děti a dorost – ordinace lékaře pro dospělé

Otázka č. 1: Setkali jste se v posledních 3 letech s klinicky nemocným pertusí?

Graf 7: Výskyt klinicky nemocných pertusí za poslední 3 roky



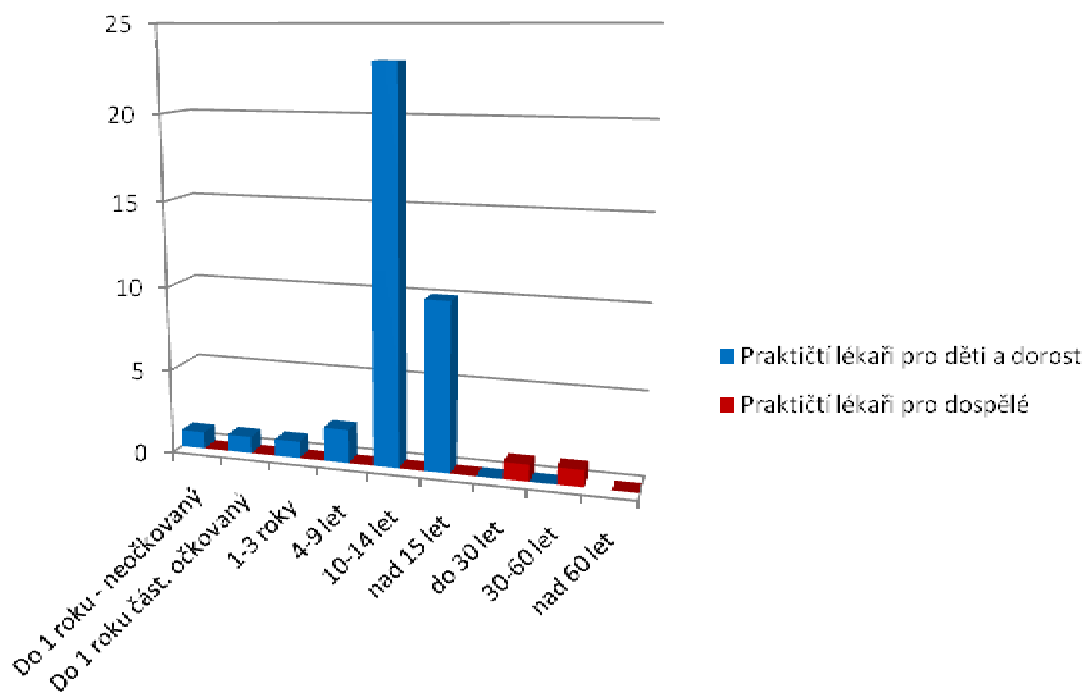
Zdroj: Vlastní výzkum

V ordinaci praktických lékařů pro děti a dorost z celkového počtu 15 respondentů se s pertusí setkala všech 15 lékařů.

V ordinaci praktických lékařů pro dospělé z celkového počtu 15 respondentů se s pertusí setkali 2 lékaři.

Otázka č. 2: Onemocnění se nejčastěji vyskytovalo v těchto věkových kategoriích:

Graf 8: Výskyt onemocnění pertusí podle věkových kategorií



Zdroj: Vlastní výzkum

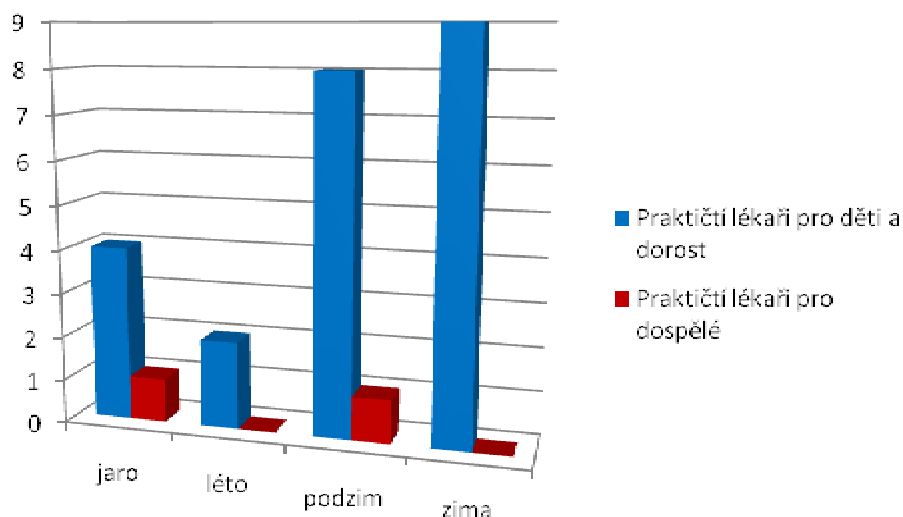
V ordinaci dotazovaných lékařů pro děti a dorost bylo zaznamenáno celkem 38 případů pertuse. Největší nárůst onemocnění se pohyboval ve věkové kategorii 10–14 let, v níž pertusí onemocnělo 23 pacientů. Druhá nejčastěji postižená věková kategorie byly děti ve věku nad 15 let, kde onemocnělo 10 jedinců. Dále se onemocnění vyskytlo ve věkové kategorii 4–9 let s počtem 2 případy a po 1 případu v ostatních věkových kategoriích. V jednom z případů ve věkové kategorii do 1 roku – neočkovaní musel být pacient hospitalizován, v ostatních případech probíhala léčba pacientů v domácím prostředí.

V ordinaci dotazovaných lékařů pro dospělé byly zaznamenány 2 případy onemocnění pertusí. Onemocnění se vyskytlo v jednom z případů ve věkové kategorii

do 30 let a v druhém z případů ve věkové kategorii mezi 30–60 let. Žádný z případů si nevyžádal hospitalizaci.

Otázka č. 3: V jakém nebo v jakých ročních obdobích se onemocnění vyskytlo?

Graf 9: Výskyt onemocnění pertusí podle ročního období



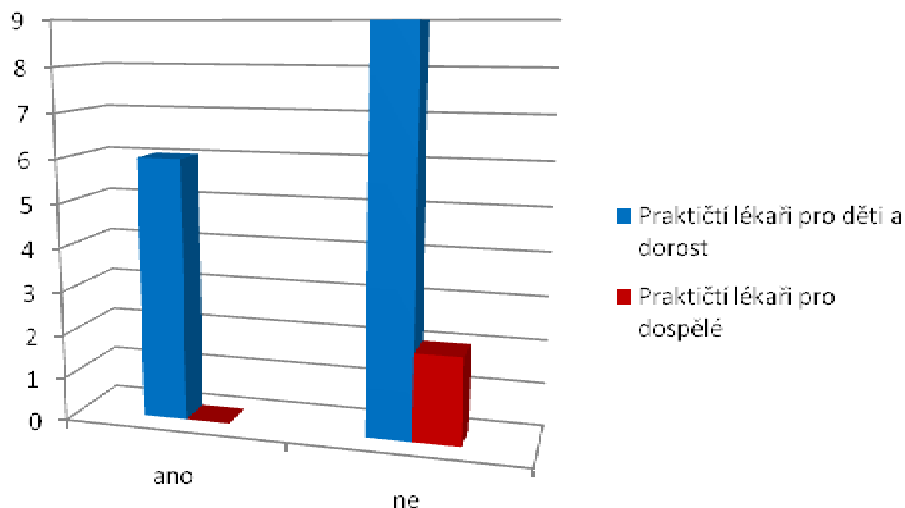
Zdroj: Vlastní výzkum

Ordinaci praktických lékařů pro děti a dorost navštívili nemocní pertusí nejvíce na podzim, v zimě a na jaře. V letních měsících je nárůst oproti podzimním, zimním a jarním měsícům nižší. Zvýšená návštěvnost nemocných s pertusí na jaře byla 4krát zvolená odpověď. Odpověď na podzim byla 8krát zvolená, odpověď v létě byla 9krát zvolená a odpověď v zimě byla 2krát zvolená, přičemž sedm lékařů na jednu otázku odpovědělo dvěma odpověďmi.

Ordinaci praktických lékařů pro dospělé navštívili nemocní v jarním a v podzimním měsíci.

Otázka č. 4: Nakazil se pacient prokazatelně od rodinných příslušníků?

Graf 10: Zdroj nákazy v rodině



Zdroj: Vlastní výzkum

6 praktických lékařů pro děti a dorost označilo, že se děti nakazily od rodinných příslušníků, a to nejčastěji od sourozenců. Někteří se nakazily také od rodičů nebo bratranců a sestřenic.

Pacienti praktických lékařů pro dospělé se prokazatelně nenakazili od rodinných příslušníků.

Otázka č. 5: Z jaké spádové oblasti pacient pocházel?

Nejvíce pacientů z ordinace lékařů pro děti a dorost pocházelo ze Suchdola nad Lužnicí. Další výskyt pertuse byl zaznamenán v Jindřichově Hradci, v Českých Velenicích, v Nové Bystřici, v Kunžaku, ve Studené, v Pístině.

Pacienti nakažení pertusí z ordinace lékařů pro dospělé pocházeli z Jindřichova Hradce.

Otázka č. 6: Kolik vašich pacientů muselo být hospitalizováno?

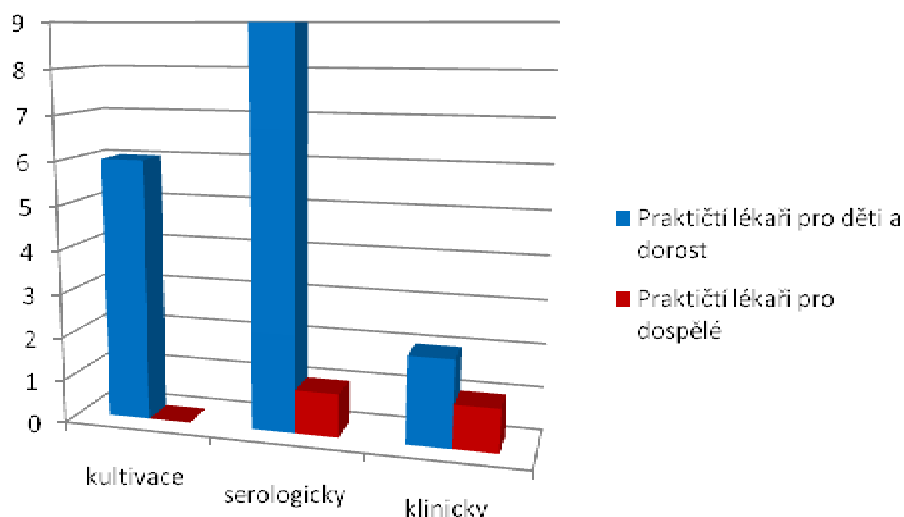
Jeden z pacientů navštěvující ordinaci lékaře pro děti a dorost musel být hospitalizován. Jednalo se o pacienta do 1 roku života dosud neočkovaného, který pocházel z vesnice Pístina. Z ordinace lékaře pro dospělé nedošlo k hospitalizaci žádného z pacientů.

Otázka č. 7: Došlo mezi vašimi pacienty k úmrtí na pertusi?

U lékařů pro děti a dorost a u lékařů pro dospělé nedošlo za poslední 3 roky k úmrtí pacienta.

Otázka č. 8: Diagnózu stanovují převážně:

Graf 11: Převážné stanovení diagnózy

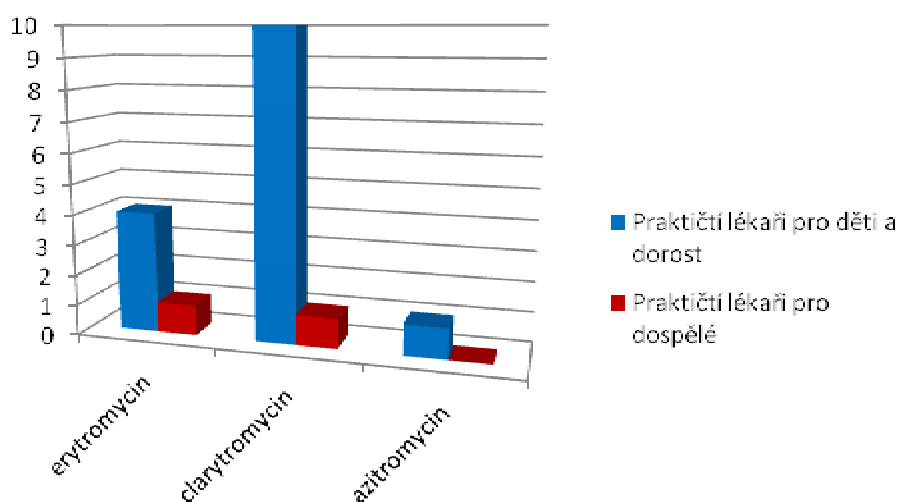


Zdroj: Vlastní výzkum

6 praktických lékařů pro děti a dorost požadovalo vyšetření na pertusi kultivačně. 9 praktických lékařů pro děti a dorost požadovalo převážně vyšetření na sérologii a 2 z dotazovaných odpověděli na otázku dvěma možnostmi, a to klinicky a sérologicky nebo kultivací. Praktický lékař pro dospělé při podezření na onemocnění pertusí požadoval výsledek stanovení sérologicky a druhý kultivačně.

Otázka č. 9: Jaká antibiotika k léčbě přednostně volíte?

Graf 12: Přednostní volba antibiotik

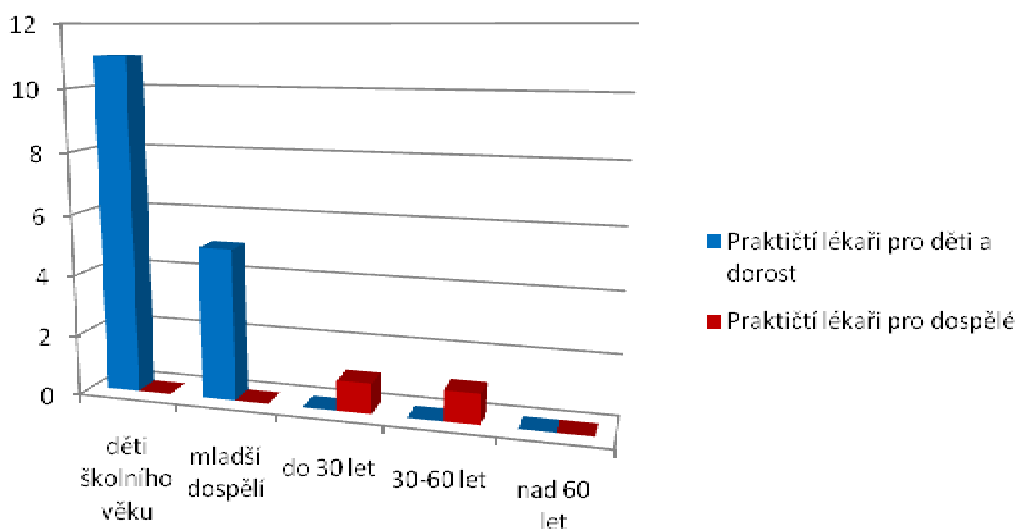


Zdroj: Vlastní výzkum

Jako lék proti onemocnění zvolili 4 praktičtí lékaři erytromycin, 10 praktických lékařů pro děti a dorost zvolilo clarytromycin a 1 z dotazovaných byl zvolen azitromycin. Praktičtí lékaři pro dospělé zvolili pro léčbu erytromycin a clarytromycin.

Otázka č. 10: Myslíte, že je vhodné zavést plošné přeočkování pacientů určitých věkových skupin?

Graf 13: Názor na zavedení plošného přeočkování pacientů určitých věkových skupin



Zdroj: Vlastní výzkum

Na otázku odpovídalo 30 dotazovaných respondentů, kterými byli praktičtí lékaři pro děti a dorost a praktičtí lékaři pro dospělé. Na otázku o zavedení plošného přeočkování pacientů odpověděli praktičtí lékaři pro děti a dorost v 11 případech první odpovědí. Podle nich by mělo dojít k plošnému přeočkování dětí školního věku. 5 z 11 lékařů uvedlo, že plošné přeočkování této věkové skupiny je už zavedeno. 5 z 11 praktických lékařů pro děti a dorost zvolilo, že by mělo dojít k plošnému přeočkování ve věkové skupině mladších dospělých. Z praktických lékařů pro dospělé odpovídali na poslední otázku 2 lékaři, kteří se s pertusí za poslední 3 roky setkali. Na poslední otázku dotazníku zvolil 1 z praktických lékařů pro dospělé 2 odpovědi, kterými jsou přeočkování ve věkové skupině do 30 let a ve věkové skupině 30–60 let. Druhý

z praktických lékařů by plošné přeočkování ve věkové skupině do 30 let, ve věkové skupině 30–60 let a ve věkové skupině nad 60 let nezavedl.

4.5.1. Shrnutí informací získaných z vyplněných dotazníků

Z dotazníku jsem zjistila, že s onemocněním způsobené *Bordetella pertussis* se setkávají hlavně praktičtí lékaři pro děti a dorost. Velmi nebezpečná je infekce pro děti do 1 roku věku, dítě je ohroženo na životě a musí být hospitalizováno. Díky kvalitní péči se žádný z lékařů s úmrtím na pertusi neseťkal. Mezi nejčastější věkové skupiny, které se s bakterií setkávají patří děti ve věku 10–14 let a děti nad 15 let. Jde o věkové skupiny, kde obranyschopnost proti infekci klesla na minimum nebo už nepřetrvává. Zároveň jsou to ročníky, které se „vyhnuli“ přeočkování nově zavedenou vakcínou v roce 2009. První příznaky onemocnění jsou nejčastěji pozorovatelné na podzim, v zimě a na jaře. Největší výskyt nemocných pertusí byl zaznamenán v Suchdole nad Lužnicí. Nakazit se mohou děti i od rodinných příslušníků. Nejčastěji se od sebe navzájem nakazili sourozenci a v některém z případů došlo i k přenosu infekce z matky na dítě. Lékaři požadují častěji vyšetření sérologické. Nejčastěji lékaři k léčbě dávivého kašle volí antibiotikum clarytromycin. 5 praktických lékařů z 11 dotazovaných by zavedlo přeočkování ve věkové skupině mladších dospělých.

5. Diskuze

Výsledky pro bakalářskou práci byly zhotoveny z výsledků praktických metod prováděných v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o., z informací a dat poskytnutých hygienickou stanicí v Jindřichově Hradci, mikrobiologickou laboratoří Laboma s.r.o. a z vyplněných dotazníků, které byly rozdány v ordinacích praktických lékařů z Jindřichova Hradce a okolí. Všechny hypotézy po provedeném výzkumu se mi podařilo potvrdit.

Hypotéza 1: Kultivační diagnostika *Bordetella parapertussis* je opravdu časově méně náročná. Kolonie bakterie vyrůstají na půdě už během 2–3 dnů na rozdíl od *Bordetella pertussis*, které trvá růst déle. *B. parpaertussis* se od *B. pertussis* také liší typem půdy, na kterých její růst probíhá. Bakterie *B. parapertussis* je méně citlivá, a proto vyrůstá, na rozdíl od *B. pertussis*, ještě na KA. Vzhledově se od sebe kolonie jednotlivých bakterií hůře rozeznávají. U *Bordetella parapertussis* bývají kolonie porcelánově bílé a lesklé na rozdíl od druhé bakterie, u které se kolonie zdají být spíše průhlednější, bílé, lesklé. V okolí kolonie *B. parapetrussis* je navíc viditelná tmavěhnědá pigmentace a hemolýza. Aglutinaci vytváří na rozdíl od *B. pertussis* v séru anti *Bordetella parapertussis*. Také v ureázovém a oxidázovém testu se chovají obě bakterie rozdílně. Pro bakterii *Bordetella parapertussis* je charakteristický pozitivní test na ureázu, který je pro druhou bakterii *B. pertussis* negativní. Test prokazuje enzymy ureázy. Po zhodnocení stanovení citlivosti jednotlivých bakterií na antibiotika se *Bordetella parapertussis* lišila v citlivosti u jednoho antibiotického disku. Na rozdíl od *B. pertussis* se na cefuroxim prokázala rezistentní. Na první pohled podobné bakterie se po zhodnocení výsledků z provedených testů opravdu liší.

Hypotéza 2: Hypotézu 2 potvrdily informace patrné ze třech vypracovaných grafů. V prvním grafu byly zaznamenány informace za poslední 3 roky z mikrobiologické laboratoře Laboma s.r.o. Graf potvrdil, že výskyt pertuse a parapertuse v ročním období je větší na podzim, v zimě a na jaře. Stejně výsledky byly získány z druhého grafu, který zaznamenával výskyt bakterií na Jindřichohradecku. Část hypotézy 2 potvrdili také praktičtí lékaři, kteří zvolili odpověď na podzim, v zimě a na jaře v dotazníku na otázku: V jakém nebo v jakých ročních obdobích se onemocnění pertusí vyskytlo? Na

podzim, v zimě a na jaře se děti pohybují v úzkém kolektivu, jako jsou školy a školky, šíření onemocnění je proto rychlejší. Dalším faktorem, který může ovlivnit výskyt bakterie v ročním období je vliv počasí na organismus člověka. Podzim, zima a jaro jsou studené měsíce, které ho zatěžují. Oslabený jedinec snáze v těchto měsících onemocní.

Hypotéza 3: Parapertuse a pertuse se nejčastěji vyskytuje ve věkové skupině dětí 10–14 let. Informace získané z mikrobiologické laboratoře Laboma s.r.o. a z hygienické stanice v Jindřichově Hradci hypotézu potvrzují. Výskyt bakterie *Bordetella pertussis* potvrzují také informace z dotazníku, který vyplňovali praktičtí lékaři z Jindřichova Hradce a okolí. Nejčastější výskyt ve věkové skupině dětí 10–14 let je podle mě způsoben mizivou ochranou této věkové skupiny před onemocněním a zároveň neúčastí v nově zavedeném přeočkování v roce 2009. Jedná se o skupinu dětí pohybujících se ve školních kolektivech, a proto je mezi nimi rychlost nákazy větší.

6. Závěr

Bordetella parapertussis a *Bordetella pertussis* jsou původci infekcí postihující dýchací cesty. U jedinců napadených bakterií *Bordetella pertussis* se rozvine vysoce infekční onemocnění zvané černý kašel. U nakažených parapertusí jsou klinické projevy mírnější než u nakažení pertusí. Z tohoto důvodu se ve světě dostává většího zájmu právě *Bordetella pertussis*. Přenos infekce se uskutečňuje hlavně kapénkovou cestou. K přenosu dochází nejčastěji v uzavřených místnostech a velkých kolektivech.

Největší nebezpečí představuje nakažení pertusí v prvním roce života. Po zavedení povinného očkování v ČR v roce 1958 se počet onemocnění snížil na minimum. V posledních letech byl zaznamenán nárůst nakažených ve věkové skupině 9–15 let. Situace byla zapříčiněna mizivou nebo nulovou obranyschopností organismu. Odolnost proti infekci se postupem věku snižuje. Řešením situace bylo zavedení přeočkování v roce 2009 dětí školního věku mezi 10. a 11. rokem života.

Na začátku práce jsem si stanovila celkem šest cílů. Všechny se mi podařilo splnit. Obecné znalosti o bakteriích *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* shrnuji v současném stavu a metody kultivace a identifikace popisuji v metodice. V ní je popsán i postup zjištění citlivosti kmene na daná antibiotika. Výsledky kultivačních metod jsem uvedla ve čtvrté kapitole, kde také uvádím výsledky výskytu bakterií za poslední 3 roky v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. a výsledky z hygienického ústavu v Jindřichově Hradci. Dále jsem do čtvrté kapitoly zařadila výsledky získané z dotazníků, které byly rozdány v ordinacích praktických lékařů pro děti a dorost a praktických lékařů pro dospělé.

Na základě stanovených cílů byly vypracovány tři hypotézy. Hypotéza 1 – Kultivační diagnostika *Bordetella parapertussis* bude časově méně náročná než diagnostika *Bordetella pertussis*. Hypotéza 2 – Výskyt *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* je vyšší v podzimních, zimních a jarních měsících. Hypotéza 3 – Výskyt *Bordetella pertussis* a *parapertussis* je nejčastější ve věkové skupině dětí 10–14 let.

Výzkum ukázal, že bakterie *Bordetella parapertussis* je opravdu odlišná od bakterie *Bordetella pertussis* i přesto, že způsobuje na první pohled podobné onemocnění. Odlišnost spočívá v růstové náročnosti bakterií, ve vzhledu kolonií, ve vytvoření

hemolýzy a pigmentace, ve výsledcích ureázových i oxidázových testů, ale i ve stanovení citlivosti na antibiotika. S *Bordetella parapertussis* a *Bordetella pertussis* se nejčastěji setkáme v chladných měsících, kdy je snižená obranyschopnost populace, děti se pohybují ve větších kolektivech, jakým je škola a školka, kde se infekce rychleji šíří. *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* nejčastěji napadá děti ve věku 10–14 let, protože jsou to skupiny dětí, které mají sníženou nebo nulovou imunitu proti těmto bakteriím. Další příčinou může být „únik“ této věkové kategorie z povinného přeočkování dětí mezi 10. a 11. rokem věku.

Má bakalářská práce by mohla být použita na seminářích pro zdravotnické pracovníky i na školách příslušného typu vzdělání. Může být publikována v časopisech nebo na internetu, aby se široká veřejnost mohla seznámit se současnou problematikou *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*.

Měli bychom si uvědomit, že bakterie *Bordetella parapertussis* a *Bordetella pertussis* jsou původci vážného a velmi nepříjemného onemocnění. Zvláště v případě podcenění černého kašle u dítěte dochází k úmrtí. Proto je velmi důležitý přístup všech odborníků k této nemoci. Důležité jsou časně a správné laboratorní výsledky, správná diagnóza a správná léčba, které mají vliv na snížení nemocnosti, zlehčení vážnosti komplikací a minimalizují úmrtnost.

7. Klíčová slova

Bordetella pertusis - *Bordetella pertussis*

Bordetella parapertussis - *Bordetella parapertussis*

aerobní gramnegativní kokobacil - aerobic gram-negative kokobacil

černý kašel - Whooping cough

makrolidy - makrolids

Laboratorní diagnostika černého kašle - Laboratory diagnosis of looping cough

půda Bordetova-Gengouova -Soil Bordet-Gengou

8. Seznam použitých zdrojů:

- 1) Madigan, Martinko – Dunlap, Clark. *Biology of mikroorganismus. 12end edition.* San Francisco : Pearson education, 2009. 970-971 s. ISBN: 0-321-53615-0
- 2) Blechová, Zuzana. *Opomíjená infekce-pertuse*, *Pediatric pro praxi*, 2008. roč. 9. č. 4 . s. 223-226. ISSN: 1213-0494
- 3) Beneš, Jiří a kol. *Infekční lékařství. Praha: Galén 2009.* 228-231 s. ISBN-13: 978-80-7262-644-1
- 4) Klaban, Vladimír. *Svět mikrobů, ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí*, druhé rozšířené a přepracované vydání, Hradec Králové, Gaudeamus, 2001.75-76 s. ISSN:80-7041-687-4
- 5) Duřpektová, M. – Hrstková, H. – Valníčková, Z. *Problematika pertuse v dětském věku.* *Československá pediatrie*, 2006. roč, 61. č, 1. s. 6-11
- 6) Votava, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*, dotisk. Brno:Neptun, 2006. 495s. ISBN 80-902896-6-5
- 7) Votava, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii.* Brno: Hortus, 1999. 76-77 s. ISBN: 80-238-50 58-X
- 8) Hučková, Daniela a kol. *Možnost včasnej diagnostiky pertuse.* [online] 2009 [cit.2011-01-23]. Dostupné z: http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=3990&magazine_id=4

9) Kramář, Radim. *Lékařská mikrobiologie*. České Budějovice. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2007. 15-16 s. ISBN 978-80-7394-021-8

10) Zavadilová, Jana – Fabiánová, Kateřina – Maixnerová, Marina. *Doporučení pro laboratorní diagnostiku dávivého kašle*. Zprávy Epidemiologie a Mikrobiologie (SZÚ,Praha), 2009. roč, 18. č, 1. s. 24. ISSN: 1803-6422

11) Maixnerová, Mariana – Křížová, Pavla. *Posílení činnosti NRL pro pertusi a parapertusi*. Zprávy CEM, 2007. roč, 16. č, 2. s. 82-83 ISSN: 1211-7358

12) Kosina, Pavel – Krausová, Jana. *Očkování proti pertusi*. Vakcinologie, 2007. roč, 8. č., 2. s. 96-99. ISSN: 1213-0494

13) Škovránková, Jitka – Komárek, Vladimír – Paděrová, Kateřina. *Indikace očkování proti tetanu, záškrtu a černému kašli vakcínou obsahující acelulární perkusovou složku*. [online] 2004 [cit.2011-01-23]. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-200402-0004.php>

14) Zavadilová, Jana – Fabiánová, Kateřina – Maixnerová, Mariana. *Doporučení pro laboratorní diagnostiku dávivého kašle*. Zprávy Epidemiologie a Mikrobiologie (SZÚ,Praha), 2009. roč, 18. č, 1. s. 24-25. ISSN: 1803-6422

15) Vospělová Jarmila - Zapletalová Jiřina. *Stále akutní pertuse*. [online] 2004 [cit.2011-01-23]. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-200404-0008.php>

16) Fabiánová, Kateřina – Kříž, Bohumír. *Pertuse a současné možnosti očkování*. Vakcinologie, 2007. roč, 1. č, 2. s. 70-79. ISSN: 1802-3150

17) Edwards, KM. - Decker, DM. *Pertussis valine*. In PLTKIN. SA. ORENSTEIN. WA. Vaccines. 4th edition. Philadelphia, 2004. 471-521s. ISBN 0-7216-9688-0

18) Marešová, Vilma. *Pertuse a pertusoidní syndrom*. Vox pediatrie, 2003. roč. 3. č. 3. s. 26-28. ISSN: 1213-2241

19) Ryšková, Lenka. *Lékařská fakulta UK v Hradci Králové., Bakteriologie*. [online] 2007 [cit. 2011-01-23]. dostupné z <http://www.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/diagnostika/bakteriologie.htm>

20) Fabiánová, Kateřina – Prýkazský, Vladimír – Maixnerová, Marina - Beneš Čestmír – Částková, Jitka. *Epidemiologická situace ve výskytu pertuse a parapertuse v období 1996-2005, na území ČR a Jihomoravského kraje*. [online] 2007 [cit. 2011-02-21]. <http://www.szu.cz/publikace/zpravy-centra-epidemiologie-a-mikrobiologie/cislo-2-unor-2007>

21) Hynčica, Viktor. Státního zdravotního ústavu. *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2000-2009 – relativně*. [online] 2009 [cit. 2011-01-23] dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-relativne?highlightWords=pertusse>

22) Beran, Jiří – Havlík, Jiří a kol. *Lexikon očkování*. Praha:Maxdorf, 2008. 100-106 s. ISBN: 978-80-7345-164-6

23) Kosina, Pavel – Krausová, Jana. *Očkování proti pertuse*. Pediatrie pro praxi, 2007. roč. 8. č. 2. 96-98s. ISSN: 1213-0494

24) Hrodek, Otto – Vavřínek, Jan. *Pediatric*. Praha: Galén, 2002. 623 s. ISBN:80-7262-178-5

25) test.line.cz [online] 2009 - 2011 [cit. 2011-03.21]. dostupný z: <http://www.test-line.cz/oxistrip>

26) itest-plus.cz [online] 2008 [cit. 2011-03.21]. dostupné z: <http://www.itest-plus.cz/diagnosticke-pripravky-cz/diagnosticke-disky-cz/itest-urea-cz>

27) Maixnerová, Mariana. *Současná problematika dávivého kašle*. Vox pediatrie, 2005. roč, 5. č, 4. 22-24 s. ISSN: 1213-2241

28) Fabiánová, Kateřina – Kříž, Bohumír - Beneš Čestmír. *Vývoj onemocnění pertusí v ČR v letech 1982-2009*. Zprávy Epidemiologie a Mikrobiologie. Praha, 2009. roč, 18. č, 12. 368-370 s. ISSN: 1803-6422

29) Votava, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná, druhé přepracované vydání*. Brno: Neptun, 2005. 351s. ISBN: 80-86-850-00-5

30) ordinace.cz [online]. [cit. 2011-03.21]. : dostupné z : <http://www.ordinace.cz/clanek/cerny-kasel-loni-temer-tisic-pripadu-nebezpecny-je-hlavne-pro-miminka/>

31) Murray, P.R. (editor in chief). *Manual of Clinical Microbiology, 8th ed.* ASM Press. Washington. D.C., 2003. 376-377s. ISBN 1-55581-255-4

9. Přílohy

Příloha 1. Dotazník

Příloha 2. Obrázky

Příloha 3. Použité zkratky

Příloha 1. Dotazník

Zdroj: Vlastní šetření

Dotazník určený praktickým lékařům pro děti a dorost

DOTAZNÍK

Vážené lékařky, vážení lékaři,

jmenuji se Petra Šimánková a jsem studentkou Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích obor zdravotní laborant.

Ráda bych Vás požádala o vyplnění tohoto dotazníku. Dotazník je zcela anonymní a získané údaje budou použity jako podklad pro moji bakalářskou práci s tématem: „Problematika bordetelly pertussis a parapertussis“. Při vyplňování dotazníku zakroužkujte prosím Vámi zvolenou odpověď (v případě potřeby zakroužkujte více možností) a u některých otázek se vyjádřete slovně.

Předem děkuji za jeho vyplnění, Vaši ochotu a čas.

S přáním příjemného dne

Petra Šimánková

1. Setkali jste se v posledních 3 letech s klinicky nemocným pertusí?

(Pokud ano, uveďte prosím počet pacientů.)

- a) ano, s..... pacientem/y
- b) ne

2. Onemocnění se nejčastěji vyskytovalo v těchto věkových kategoriích:

(Prosím, jednotlivé kategorie odstupňujte od 1 do 3. Nejčastěji se vyskytující označte číslem 1. Pokud se onemocnění vyskytlo jen u dvou věkových kategoriích, označte je jako 1 a 2 a nevyhovující kategorii označte číslem 0.)

- a) pacient do 1 roku, dosud neočkovaný
- b) pacient do 1 roku, očkovaný
- c) pacient 1-3 roky starý
- d) pacient 4-9 let (Uveďte přesný věk pacientů.....)
- e) pacient 10-15 let (Uveďte přesný věk pacientů.....)
- f) pacient nad 15 let (Uveďte přesný věk pacientů.....)

3. V jakém nebo v jakých ročních obdobích se onemocnění vyskytlo?

- a) na jaře
- b) v létě
- c) na podzim
- d) v zimě

4. Nakazil se pacient prokazatelně od rodinných příslušníků?

(Pokud ano uveďte od koho.)

- a) ano, nakazil se od
- b) ne

5. Z jaké spádové oblasti pacient pocházel?

.....

6. Kolik Vašich pacientů muselo být hospitalizováno?

(Prosím u věkových kategorií uveďte počet.)

- a).....pacient/i do 1 roku,dosud neočkovaný
- b).....pacient/i do 1roku,očkovaný
- c).....pacient/i 1-3 roky starý
- d) pacient/i 4-9 let
- e) pacient/i 10-15 let
- f) pacient/i nad 15
- g) žádný z pacientů nemusel být hospitalizován

7. Došlo mezi vašimi pacienty k úmrtí na pertusi?

(Pokud ano, uveďte prosím věk pacienta/ů.)

- a) ano, ve věku
- b) ne

8. Diagnózu stanovují převážně:

- a) kultivací
- b) serologií
- c) klinicky

9. Jaká antibiotika k léčbě přednostně volíte?

(Pokud volíte jiná ATB, vypište prosím jaká.)

- a) erytromycin
- b) claritromycin
- c) azitromycin
- d) jiné

10. Myslíte, že je vhodné zavést plošné přeočkování pacientů určitých věkových skupin?

- a) ano, u dětí školního věku
- b) ano, u mladších dospělých
- c) ne, protože
-
-

V případě jakýchkoli dotazů mne prosím kontaktujte na email p.simankova@seznam.cz

Dotazník určený praktickým lékařům pro dospělé

DOTAZNÍK

Vážené lékařky, vážení lékaři,

jmenuji se Petra Šimánková a jsem studentkou Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích obor zdravotní laborant.

Ráda bych Vás požádala o vyplnění tohoto dotazníku. Dotazník je zcela anonymní a získané údaje budou použity jako podklad pro moji bakalářskou práci s tématem: „Problematika bordetella pertusis a parapertussis“. Při vyplňování dotazníku zakroužkujte prosím Vámi zvolenou odpověď (v případě potřeby zakroužkujte více možností) a u některých otázek se vyjádřete slovně.

Předem děkuji za jeho vyplnění, Vaší ochotu a čas.

S přáním příjemného dne

Petra Šimánková

1. Setkali jste se v posledních 3 letech s klinicky nemocným pertusí?

(Pokud ano, uveďte prosím počet pacientů.)

- a) ano, s..... pacientem/y
- b) ne

2. Onemocnění se nejčastěji vyskytovalo v těchto věkových kategoriích:

(Prosím, jednotlivé kategorie odstupňujte od 1 do 3. Nejčastěji se vyskytující označte číslem 1. Pokud se onemocnění vyskytlo jen u dvou věkových kategoriích, označte je jako 1 a 2 a nevyhovující kategorii označte číslem 0.)

- a) pacient do 30 let (Uveďte přesný věk pacientů.....)
- b) pacient 30-60 let (Uveďte přesný věk pacientů.....)
- c) pacient nad 60 let (Uveďte přesný věk pacientů.....)

3. V jakém nebo v jakých ročních obdobích se onemocnění vyskytlo?

- a) na jaře
- b) v létě
- c) na podzim
- d) v zimě

4. Nakazil se pacient prokazatelně od rodinných příslušníků?

(Pokud ano uveďte od koho.)

- a) ano, nakazil se od
- b) ne

5. Z jaké spádové oblasti pacient pocházel?

.....
.....

6. Kolik Vašich pacientů muselo být hospitalizováno?

(Prosím u věkových kategorií uveďte počet.)

- a).....pacient/i do 30 let
- b).....pacient/i do 30-60 let
- c)..... pacient/i nad 60 let
- d) žádný z pacientů nemusel být hospitalizován

7. Došlo mezi vašimi pacienty k úmrtí na pertusi?

(Pokud ano, uveďte prosím věk pacienta/ů.)

- a) ano, ve věku let
- b) ne

8. Diagnózu stanovují převážně:

- a) kultivací
- b) serologií
- c) klinicky

9. Jaká antibiotika k léčbě přednostně volíte?

(Pokud volíte jiná ATB, vypište prosím jaká.)

- a) erytromycin
- b) claritromycin
- c) azitromycin
- d) jiné

10. Myslíte, že je vhodné zavést plošné přeočkování pacientů určitých věkových skupin?

a) ano, u pacientů do 30 let

b) ano, u pacientů mezi 30-60 let

c) ano, u pacientů nad 60 let

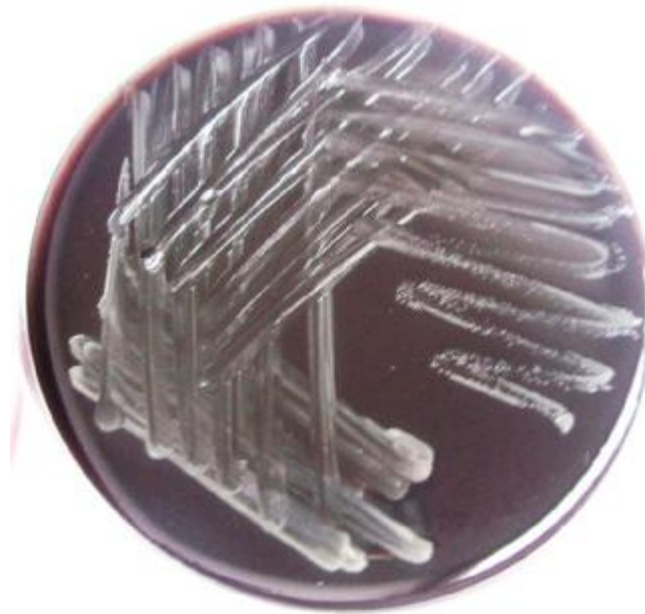
e) ne, protože.....
.....
.....
.....

V případě jakýchkoli dotazů mne prosím kontaktujte na email p.simankova@seznam.cz

Příloha 1: Vlastní výzkum

9.2. Příloha 2. Obrázky

Obr.1: Narostlá půda Regan-Lowe *B. pertussis*



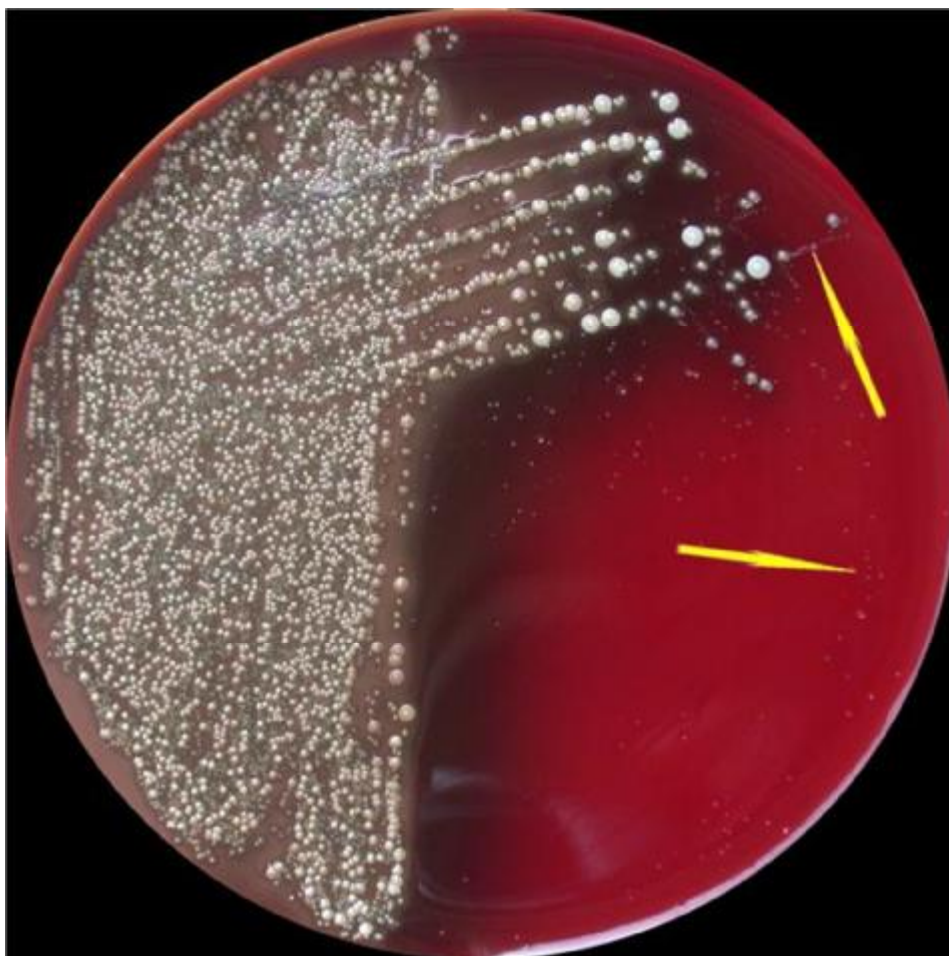
Zdroj: Vlastní

Obr.2: Kolonie *B. pertussis*



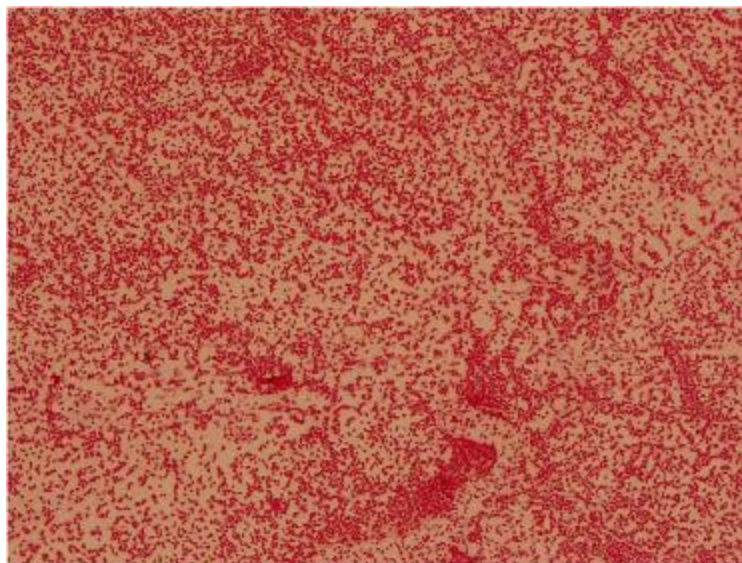
Zdroj: Vlastní

Obr. 3: Narostlé kolonie *B. parapertussis* na krevním agaru



Zdroj: Státní zdravotní ústav

Obr. 4: Mikroskopie bakterie *Bordetella pertussis*



Zdroj : Vlastní

Obr. 5: bakterie *Bordetella pertussis*



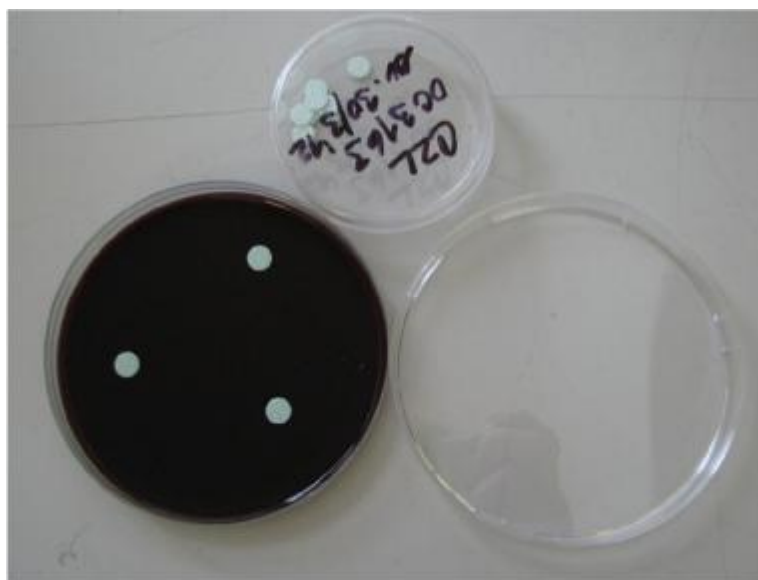
Zdroj : sciencephotolibary

Obr.6: Rozdělená a popsaná půda Regan- Lowe



Zdroj: Vlastní

Obr.7: Více vzorky naočkovaná půda Regan – Lowe



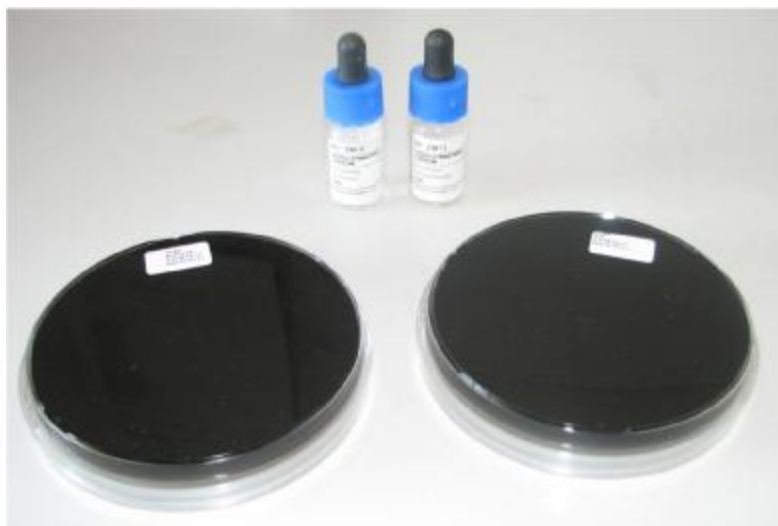
Zdroj: Vlastní

Obr. 8: Půdy před vložením do termostatu



Zdroj: Vlastní

Obr. 9: Diagnostická séra anti *B.pertussis* a anti *B.parapertussis* a kulturační půdy Regan-Lowe



Zdroj: Vlastní

Obr. 10: Antibiotické disky



Zdroj: Vlastní

Obr. 11: Příklad na poklad antibiotických disků



Zdroj: Vlastní

Obr. 12: Ureázový test



Zdroj: Vlastní

Obr. 13: Pozitivní ureázový test



Zdroj: Vlastní

Obr. 14: Vzorky obarvené podle Grama



Zdroj: Vlastní

Příloha 3. Použité zkratky

Použitá zkratka	Vysvětlení
ADP	adenosindifosfát
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
S1,S2,S3,S4	Subjednotka 1,2,3,4
CR3	Glykoproteinový faktor
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
PT	Perkusový toxín
ATC	Adenylcyclázový toxín
TCT	Tracheální toxín
DNT	Dermonekrotický toxín
LPS	Lipopolysacharid
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
IL-1	Interleukyn 1
TNF-alfa	Tumornekrosis faktor alfa
DPT	Diphtheria, Pertussis, Tetanus vakcine
tRNA	Transferovaná ribonukleová kyselina
PRN	Prelaktin
TCF	Tracheální kolonizační toxín
BrkA	Faktor rezistence
RLA –	Regan_Lowe agar bez cefalosporinu
RLA +	Regan_Lowe agar s cefalosporinem
KA	Krevní agar
NRL	Národní referenční laboratoř
KHS	Krajská hygienická stanice
ATB	Antibiotika
ČR	Česká Republika