

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Vyšetřování chlamydií v urogenitálním traktu

Bakalářská práce

Autor: Radka Bendová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant
Vedoucí práce: MUDr. Eva Žampachová
Datum odevzdání: 3.5.2013

Abstrakt

Tématem práce je vyšetřování chlamydií v urogenitálním traktu metodou kultivace.

Cílem práce bylo vyzkoušet kultivační metodiku diagnostiky *Chlamydia trachomatis* na tkáňových kulturách, zhodnotit výsledky podle jednotlivých kritérií za určité období a výsledky porovnat s literárními údaji. Laboratoř virologie v Nemocnici České Budějovice, a.s. je na přípravu tkáňových kultur zařízená a pro tuto metodu používají neobyčejnou linii buněk BGM. Ve světě se téměř nepoužívá. Na tomto pracovišti se tato linie osvědčila a používají ji již od roku 1985, kdy ji dostali.

Práce informuje o současném stavu chlamydií, jejich klasifikaci podle fylogenetických a genomových analýz bakterií, o jejich výskytu, růstovém cyklu a množení. Dále se práce věnuje chlamydiálním infekcím rozdělené na oční a urogenitální infekce a jejich léčbě. Přehled současného stavu problematiky je ukončen metodami průkazu, přímý a nepřímý průkaz. V přímém průkazu jsou popsány tkáňové kultury, jejich příprava a kultivace. Tuto metodu jsem ověřovala v praktické části mé bakalářské práce.

V rámci této bakalářské práce mi byly poskytnuty vzorky z urogenitálního traktu, které jsem hodnotila třemi kategoriemi: pozitivní, negativní a nelze hodnotit (= vzorky byly přerostlé bakteriemi nebo kvasinkami a nebylo možné je vyhodnotit). Byly to povětšinou stěry z uretry a cervixu (u žen) nebo jen z uretry (u mužů).

Celkový počet vyšetřovaných vzorků bylo 159 za období od 18.10. do 5.12. roku 2011. Chlamydie rostou na tkáňových kulturách 48hodin a poté se barví modifikovaným barvením dle Macchiavella. Vzorků barvených touto technikou bylo vyhodnoceno 127 (79,9%) z celkového počtu. Nejednoznačné vzorky se dále barvily monoklonální protilátkou proti *Chlamydia trachomatis*.

Touto technikou bylo barveno 32 vzorků (20,1%) z celkového počtu. Vzorky jsem hodnotila také podle věku. Neobvykle vysoká byla pozitivita (42,2%) u starších žen ve věku 26-46 let, kam spadalo i největší množství vzorků (54,2%) žen z celkového počtu. Šlo většinou o pacientky, které měly gynekologické potíže, nikdy nebyly vyšetřeny a léčeny a nebo měly chronickou infekci, která se léčí velmi obtížně a má sklony recidivovat. U mužů bylo také největší množství vzorků (56,1%) z celkového počtu řazeno do věku 26-46 let, ale pouze 13% bylo pozitivních. Rozdíl je daný velikostí souboru a také tím, že u mužů se méně často projevuje chronická infekce.

Abstract

The subject of this bachelor paper is chlamydiae examination in urogenital tract via the method of cultivation.

The aim of this paper is to test the cultivation method of diagnosis *Chlamydia trachomatis* on a tissue of culture, to evaluate the outcome according to individual criteria in a given period and to compare the outcome with the literary data. The virology laboratory in hospital in České Budějovice, a.s. Is equipped for the culture tissue preparation and for this method they use uncommon line of cells BGM, which is not commonly used in the world. In this department this line has proven and so they use it since 1985, when they received it.

This paper informs about the present situation of chlamydiae, their classification according to phylogenetic and genome bacterial analysis, about their occurrence, growth cycle and multiplication. The paper also focuses on chlamydiae infections divided into ocular and urogenital infection and their treatment. The overview of present issues is finished by the methods of evidence, direct and indirect evidence. In the direct evidence there are described the issue cultures their preparation and cultivation. This method was verified in the practical part of my bachelor paper.

For this bachelor paper I was provided with samples from urogenital tract which were evaluated in three categories: positive, negative and impossible to evaluate (samples were overgrown with bacteria or yeast cells and it was impossible to evaluate them). They were mostly smears from urethra and cervix (at women) or from urethra only (at men).

The number of all samples was 159 and they were examined during the period from 18th October to 5th December 2011. Chlamydiae grew on issue cultures for 48 hours and then they were died with modified colouring Macchiavella. 127 examples (79.9%) coloured by this technique were evaluated

from the total number. Ambiguous samples were coloured by the monoclonal antidote against *Chlamydia trachomatis*. 32 samples (20.1%) were coloured using this technique from the total number. I also evaluated the samples according to age. Unusually high was positivity (42.2%) at women at the age of 26-46. Which includes the highest number of samples (54.2%) of women from the total number. It mostly concerned patients with gynaecological difficulties who were never examined and treated or they had a chronic infection which can be treated with difficulties and inclines to relapse. At men the highest number of samples (56.1%) from the total number was at the age of 26-46 but only 13% were positive. The difference is given by the size of samples and also at men the occurrence of chronic infection is less common.

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích.....

.....

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování své vedoucí práce MUDr. Evě Žampachové za odborné vedení mé bakalářské práce, její cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala. Děkuji MUDr. Pavlu Žampachovi za poskytnuté fotografie. V neposlední řadě děkuji i mé rodině za podporu a pochopení při celé době mého studia.

Obsah

1. Současný stav	6
1.1. Chlamydie	6
1.1.1. Morfologie.....	6
1.1.2. Taxonomie.....	7
1.1.2.1. Chlamydia trachomatis.....	7
1.1.2.2. Chlamydophila pneumoniae.....	8
1.1.2.3. Chlamydophila psittaci	9
1.1.3. Elementární tělísko.....	9
1.1.4. Retikulární tělísko	10
1.1.5. Růstový cyklus	11
1.2. Chlamydiální infekce	12
1.2.1. Oční infekce	12
1.2.1.1. Trachom.....	12
1.2.1.2. Paratrachom (Inkluzní konjunktivitida)	14
1.2.1.3. Inkluzní blennorrhoea (Chlamydiová ophthalmia neonatorum)	14
1.2.2. Urogenitální infekce	15
1.2.2.1. Uretritida (zánět močové trubice) u mužů.....	15
1.2.2.2. Cervicitis (zánět děložního hrdla) u žen.....	15
1.2.2.3. Lymphogranuloma venereum.....	15
1.2.2.4. Reiterův syndrom	16
1.3. Léčba	16
1.4. Laboratorní diagnostika.....	17

1.4.1. Klinický materiál	17
1.4.2. Přímý průkaz	18
1.4.2.1. Kultivace (na tkáňových kulturách)	18
1.4.2.2. PCR (průkaz nukleové kyseliny).....	21
1.4.2.3. Průkaz Ag (přímou imunofluorescencí, ELISA nebo některou modifikací imunochromatografie)	21
1.4.3. Nepřímý průkaz	22
1.4.3.1. ELISA (průkaz protilátek IgG, IgA, IgM)	22
1.4.3.2. Nepřímá imunofluorescence (mikroimunofluorescence-MIF ve třídách IgG, IgA, IgM)	23
2. Cíl práce	24
3. Metodika	25
3.1. Charakteristika souboru.....	25
3.2. Zpracování materiálu na kultivaci	26
3.3. Modifikované barvení dle Macchiavella	27
4. Výsledky	29
5. Diskuze	36
6. Závěr	40
7. Klíčová slova	41
8. Seznam použitých zdrojů	42
9. Přílohy	46

Úvod

Chlamydia trachomatis je nejčastější sexuální patogen ve vyspělých zemích, který zatím nepodléhá povinnému hlášení. Chlamydie jsou zajímavé pro řadu oborů: gynekologii, venerologii (kožní lékařství), urologii, ale i interní obory a v neposlední řadě pro mikrobiologii. Skutečná informovanost je relativně špatná. Existují laické webové stránky, které podávají zkreslené a nepřesné informace, odborné informace jsou hůře dostupné. Akutní infekce probíhá v určité části případů asymptomaticky, pokud probíhá symptomaticky, je někdy špatně diagnostikovaná a nedostatečně léčená. Proto se na část infekcí přijde až v chronickém stádiu ve vyšším věku, kdy jsou obtížně léčitelné a mají sklon recidivovat. Zavedením nových technik a rozšířením vyšetřování se zjistilo, že jde o problém významný, proto jsem si tohle téma také vybrala.

Nejdůležitější je zaměření na prevenci, jak primární (zabránit přenosu na jinou osobu), tak sekundární (předcházet chronickým infekcím). Význam mají i zavedené screeningové programy, kdy dochází ke snížení prevalence infekce v populaci až ke snížení počtu mimoděložních infekcí. V této práci se zabývám diagnostikou *Chlamydia trachomatis* a to kultivační metodou na tkáňových kulturách, následným barvením dle Macchiavella nebo monoklonální protilátkou. V závěru budou zhodnoceny výsledky v závislosti na barvení, věku a pohlaví a porovnány s údaji z literatury.

1. Současný stav

1.1. Chlamydie

Chlamydie jsou označovány jako energetičtí parazité. Mají obě nukleové kyseliny, extrémně malý genom, vlastní metabolismus, ale nejsou schopné syntetizovat vlastní ATP a jsou závislé na zisku ATP z hostitelské buňky ⁽¹²⁾. Extracelulárně se nemnoží ⁽³⁵⁾. Jsou to jedny z mála bakterií s obligátním nitrobuněčným parazitismem, vykazují tedy unikátní biologické vlastnosti. Mají rovněž neobvyklé složení buněčné stěny - jsou strukturálně podobné gramnegativním bakteriím, mají větší množství lipidů, ale postrádají kyselinu muramovou.

Morfologie bakteriální buňky se mění při množení unikátním dvoufázovým růstovým cyklem, který se odehrává mimo i uvnitř buňky ⁽³⁶⁾. Od virů se liší tím, že mají DNA i RNA, buněčnou stěnu, ribozomy a dělí se binárně ⁽¹⁵⁾. V současné době jsou nákazy *Ch. trachomatis* a *Ch. pneumoniae* podle mnoha autorů třetím nejzávažnějším problémem světového zdravotnictví po rakovině a AIDS ⁽³⁸⁾. Chlamydie primárně napadají epitelové buňky uropoetického traktu, dýchacího ústrojí a spojivek. Infikují ale také endoteliární buňky, buňky hladkého svalu, monocyty, lymfocyty a makrofágy ⁽¹²⁾.

1.1.1. Morfologie

Chlamydie jsou malé nepohyblivé bakterie o velikosti 250 – 400 nm. Extracelulární částice jsou infekční, metabolicky inertní formy chlamydií, tzv. *elementární tělíska*. Po infekci se zvětší do velikosti 800 – 1200 nm. Tyto neinfekční, ale již metabolicky aktivní částice jsou známy jako tzv. *retikulární tělíska* ^(15, 35). Odlišit druhy chlamydií lze na základě odlišného složení bazí DNA, charakteru inkluzí s různým obsahem glykogenu, spektra hostitelů, v druhu napadených eukaryotických buněk i způsobu přenosu ⁽¹²⁾. Inkluze *Chlamydia*

trachomatis obsahuje glykogenovou matici. Tento znak má diagnostický význam (15).

1.1.2. Taxonomie

Dříve se chlamydie klasifikovaly podle fylogenetických a genomových analýz bakterií. V současné době vychází klasifikace chlamydií ze sekvenční analýzy 16S ribosomální ribonukleové kyseliny. Řád *Chlamydiales* má 4 čeledě: *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae*, *Simkaniaceae*, které mají řadu rodů, druhů a neustálé množství nových kandidátů. Čeleď *Chlamydiaceae* je dělena na dva rody: rod *Chlamydia* s druhem *Chlamydia trachomatis* a rod *Chlamydophila* s druhy *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydiphila psittaci* a *Chlamydophila pecorum* (izolován ze zvířat).

V současnosti je v rámci obou rodů již také rozlišováno více druhů, které však nejsou vnímány jako lékařsky významné (12, 36). Hlavní význam v humánní medicíně mají *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydophila pneumoniae*, které jsou lidskými patogeny. *Chlamydophila psittaci* je primárně zvířecí patogen s možností přenosu na člověka (38).

1.1.2.1. Chlamydia trachomatis

První, kdo mikroskopicky sledovali buněčné inkluze *Ch. trachomatis*, byli v roce 1907 I. Halberstaedter a S. von Prowazk a to ve stěru ze spojivky u trachomu. V roce 1959 se Jonesovi a kol. poprvé zdařilo izolovat ji z uretry. *Ch. trachomatis* byla zpočátku považována za prvoka, poté za virus a až po průkazu buněčné stěny byla zařazena mezi gramnegativní bakterie (26). Identifikována jako původce pohlavně přenosných onemocnění (STI - Sexually Transmitted Infection) ve vyspělých zemích byla až nedávno a to v roce 1975 J. T. Graystonem a S. T. Wangem a v roce 1978 J. Schachterem (29). *Ch. trachomatis* napadá buňky slizničních membrán. Infekce je lymfatickou cestou zanesena do mízních uzlin, kde se tvoří granulomatózní formace a drobné abscesy s nekrotickým a hnisavým

obsahem. Zánět se pak hojí fibrózou a jizvami ⁽³⁾. Infekce způsobené touto bakterií jsou celosvětově vůbec nejčastějšími sexuálně přenosnými onemocněními.

Chlamydia trachomatis je na celém světě zachycována jako nesmírně častý původce očních, urogenitálních a neonatálních infekcí (sérotypy D-K), lymfogranuloma venereum (sérotypy L₁, L₂, L_{2a}, L₃) a trachomu (sérotypy A, B, B_a a C) ⁽²⁸⁾. *Ch. trachomatis* mají na povrchu elementárních tělísek typově specifické proteinové antigeny, díky kterým u nich rozlišujeme 18 sérotypů. V běžné diagnostice se ale určování jednotlivých sérotypů neprovádí. Existují mezi nimi zkřížené reakce ⁽⁶⁾. *Ch. trachomatis* se klasifikuje do tří biovarů:

1. TRIC, má 14 sérovarů (A-K), způsobuje inkluzní konjunktivitidu a trachom,
2. LGV, nejméně 3 sérovary (L₁, L₂, L₃), způsobující lymfogranuloma venereum,
3. MoPn, způsobující pneumonitidu myši ⁽¹⁵⁾.

1.1.2.2. Chlamydophila pneumoniae

Roku 1965 na Tchaj-wanu byla poprvé náhodně izolována při studii trachomu. Označená byla jako TW-183. Stejný agens bylo izolováno roku 1983 u studenta s pneumonií v Seattlu v USA. Označená byla jako AR-39. Původně bylo popsáno jako nový sérotyp *Ch. psittaci* TWAR. V roce 1986 jako nový druh *Ch. pneumoniae* ⁽¹²⁾.

Chlamydophila pneumoniae se šíří interhumánním přenosem jako častá, mírně probíhající respirační infekce. Průběh onemocnění může být od lehkého onemocnění horních cest dýchacích po těžkou intersticiální pneumonii ⁽³³⁾. Může také postihnout srdce. Velmi vzácné jsou infekce *Ch. pneumoniae* u dětí ve věkové skupině 1-5 let. U dospělých způsobuje asi 5% primárních sinusitid, 4%

bronchitid, 10% nosokomiálních pneumonií a záněty horních cest dýchacích (rhinitis, pharyngitis). Prosazuje se i u „chřipkových onemocnění“ a pravděpodobně i u endokarditid a myokarditid. ^(23, 6). Onemocnění se léčí makrolidy a tetracykliny ⁽³³⁾.

1.1.2.3. *Chlamydophila psittaci*

Z hlediska epidemiologie je *Chlamydophila psittaci* známa jako antropozoonóza (podléhá povinnému hlášení). S velkým počtem sérotypů se vyskytuje u ptáků, kde hostitelem je respirační trakt (holuby, papoušci) a u savců (ovce, kozy, koně, skot, kočky, prasata) ⁽²⁾. Označení této ornitózy je psitakóza neboli papouščí nemoc. Člověk se infikuje stykem s uhynulými nebo nakaženými ptáky. Nejčastěji však vdechnutím kontaminovaného prachu. Inkubační doba je 7 až 14 dnů.

Příznaky jsou zpočátku nespecifické, průběh onemocnění mírný, subklinický, prezentující se jako nachlazení, „chřipka“ nebo jako těžká pneumonitida se zvětšením sleziny a jater. Volba léku na toto onemocnění jsou tetracykliny po dobu alespoň tří týdnů ⁽³³⁾. *Chlamydophila psittaci* je dosti odolná, udrží svou infekčnost v ptačím trusu až po několik měsíců. Důležitá je však i prevence, která spočívá v důsledné veterinární kontrole drůbežárských chovů a dováženého exotického ptactva ^(36, 6).

1.1.3. Elementární tělísko

Elementární tělíška (EBs - elementary bodies) *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydophila psittaci* mají průměr kolem 250 - 400 nm a velmi malý periplazmatický prostor. Odlišující jsou elementární tělíška *Chlamydophila pneumoniae*, které mají velký periplazmatický prostor a hruškovitý tvar o velikosti 310 x 400 nm. Na vnitřním povrchu cytoplazmatické membrány je ukotven výběžek procházející na povrch. S místem ukotvení jsou spojeny řetězce DNA ⁽¹⁵⁾. Poměr buněčných kyselin RNA a DNA je zde 1:1.

Vnější membránu EB tvoří proteiny, fosfolipidy a lipopolysacharidy (LPS). MOMP – hlavní membránový protein, představuje až 60 % z celkového množství proteinů vnější membrány. Je jedním z hlavních povrchových antigenů, druhově specifický. LPS – je druhým hlavním povrchovým antigenem, rodově specifický antigen ⁽¹⁸⁾.

Elementární tělísko je infekční, slouží k průniku do hostitelské buňky, není schopné dělit se a vyznačuje se inaktivní látkovou výměnou ⁽³⁸⁾. Při proniknutí do hostitelské buňky je chlamydie schopna zastavit fagolysosomální fúzi – buněčný obranný mechanismus ⁽¹⁸⁾. Chlamydie se extracelulárně vyskytují ve formě infekčního, metabolicky inaktivního elementárního tělíska s pevnou buněčnou stěnou, která jej chrání před vlivy prostředí. Mimo buňku je schopno přežít jen několik hodin ⁽²⁶⁾.

1.1.4. Retikulární tělísko

Retikulární tělíska všech tří druhů jsou větší (800 – 1200 nm) a mají kulatý tvar s povrchovými výběžky podobnými, jako mají elementární tělíska. Vnitřní struktura odráží stadium replikace. Na počátku cyklu jsou patrné ribozomy. Později však dochází ke změně struktury DNA a zakládá se dřevná část elementárního tělíska. V retikulárních tělískách *Chlamydia trachomatis* se tvoří glykogen.

V tělískách *Chlamydophila psittaci* a *Chlamydophila pneumoniae* se glykogen netvoří. Rozdíl chlamydií od gramnegativních bakterií je, že nelze mezi stěnou a cytoplazmatickou membránou prokázat peptidoglykan ⁽¹⁵⁾. Poměr buněčných kyselin RNA a DNA je zde 3:1. Retikulární tělísko je neinfekční, je schopno se dělit a má aktivní látkovou výměnu ⁽³⁸⁾.

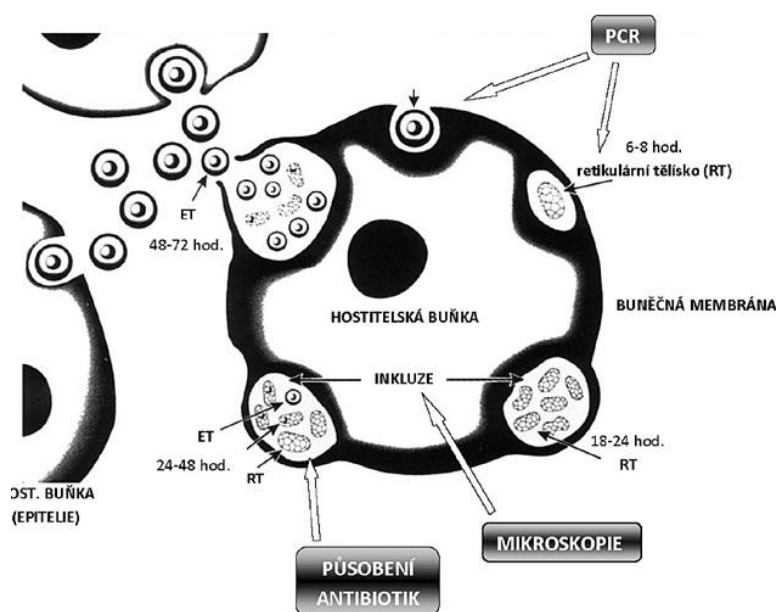
1.1.5. Růstový cyklus

Chlamydie mají růstový cyklus zcela odlišný od jiných mikroorganismů. Trvá 48-72 hodin, záleží na druhu a biovaru chlamydie a na typu napadené buňky. Počátek infekce na hostitelské buňce je zahájen receptorem zprostředkovanou infekční endocytózou elementárního tělíška (proniknutí do nitra hostitelské buňky). Tělíško zůstává ve vakuole (= endosomu) po celou dobu rozmnožovacího cyklu. Díky opakované reprodukci bakterií se toto tělíško v buňce zvětšuje a je zjevné jako tzv. inkluzní tělíško.

V této vakuole (endosomu) jsou bakterie chráněny před mikrobicidními účinky intracelulárního prostředí. Elementární tělíška se během 10 – 24 hodin zvětší a mění v neinfekční, mitoticky a metabolicky aktivní retikulární tělíška. Poté se dalších 24 - 48 hodin binárně dělí a kondenzují v elementární tělíška (až 10 000 tělíšek, která utlačují jádro i organely). Většinou tento růstový cyklus končí autolýzou hostitelské buňky, kdy se uvolní velké množství elementárních tělíšek (až 10 000). Ty ale dále pronikají do extracelulárního prostoru, infikují další hostitelskou buňku a zahájí další rozmnožovací cyklus chlamydií ^(2, 26).

Může však dojít i k exocytóze elementárních tělíšek, kdy hostitelská buňka přežívá. Nedostatkem živin, působením některých antibiotik nebo cytosinů se vytváří nedělicí se, intracelulární forma chlamydie, která má omezenou metabolickou aktivitu. Tzv. perzistentní forma chlamydie. V této formě přežívají chlamydie i několik let. Nedělí se, ale po pominutí nevyhovujících podmínek mohou znovu přejít do metabolicky aktivních retikulárních tělíšek ⁽²⁶⁾.

(Obr.1 Unikátní vývojový cyklus, formy chlamydií a jejich detekce⁽¹⁷⁾)



1.2. Chlamydiální infekce

1.2.1. Oční infekce

1.2.1.1. Trachom

Trachom je znám již tisíce let. V Evropě se vyskytoval ještě v 19. století. V zemích, kde je sanitace a hygiena na nízké úrovni a kde je mnoho much se udržuje stále⁽¹⁵⁾. Nejzamořenější je však oblast Afriky kolem Nilu. Tato, pro nás exotická nákaza, se přenáší znečištěnými prsty, případně na nožkách much. Původci trachomu jsou sérotypy A, B, Ba a C *Chlamydia trachomatis*⁽³⁸⁾.

Jako „pásma trachomu“ je označováno severní Afrika až po jihovýchodní Asii, kde ještě přetrvává problém slepoty. Slepota se vyvíjí pomalu reinfekcemi a sekundárními infekcemi, trvajících po dobu 20 až 30 let. Proces onemocnění charakterizuje 5 klíčových znaků:

1. postižení spojivky horního víčka folikulárním zánětem,
2. intenzivní zánět s difuzním ztluštěním spojivky,
3. jizvení tarzální spojivky,
4. ektropium,
5. zakalení rohovky.

Přenáší se většinou přímým kontaktem nebo se onemocnění šíří také díky mouchám, které sedají na oči pacienta a jejich okolí (tab. 1).

Tab.1 Chlamydiové infekce člověka ⁽¹⁵⁾

Místo infekce	Onemocnění	Mikrob (sérovary)
oko	trachom inkluzivní konjunktivitida ophthalmia neonatorum	C. trachomatis (A, B, Ba, C) C. trachomatis (D-K) C. trachomatis (D-K)
pohlavní ústrojí:		
u muže	uretritida, epididymitida,	C. trachomatis (D-K)
u ženy	proktitida uretritida, cervicitida, proktitida, salpingitida,	C. trachomatis (D-K)
u muže a ženy	perihépatitida, periapendicitida, neplodnost, potrat, předčasný porod lymphogranuloma venereum	C. psittaci (ovčí kmény) C. trachomatis (L1-L3)

dýchací ústrojí	dětská pneumonitida	C. trachomatis (D-K)
	faryngitida, pneumonie	C. pneumoniae
	psitakóza	C. psittaci (ptačí kmeny)
	pneumonie	C. psittaci (ovčí kmeny)

1.2.1.2. Paratrachom (Inkluzní konjunktivitida)

Paratrachom vyvolávají sérovary D až K *Ch. trachomatis*. Vyskytuje se většinou u sexuálně aktivních dospělých přenosem z genitálu do oka ⁽¹⁵⁾. V prvních 14 dnech je spojivka v oku překrvená s mukózní sekrecí, která později přechází v hnisavou. Poté zánět přejde i na rohovku a zduří se i příušní uzliny ⁽³⁹⁾. V akutním stádiu se projevuje jako folikulární konjunktivitida. Není-li léčena, přetrvává jako hlenohnisavý exsudát. U tohoto onemocnění však nevzniká slepota. Rohovka se sice jizví, ztlušťuje se pannus a vzniká léze rohovky, ale vše se spontánně vyhojuje ⁽¹⁵⁾. Léčbou tetracyklinovými antibiotiky příznaky během 48 hodin ustupují. Samozřejmě se musí léčit i sexuální partner ⁽³⁸⁾.

1.2.1.3. Inkluzní blenorhoea (Chlamydiová ophthalmia neonatorum)

Chlamydiové onemocnění u novorozenců. Ti se infikují od matky při průchodu porodními cestami. U nich se během několika dní po porodu vyvine konjunktivitida s purulentní sekrecí a s možností vzniku pneumonie ⁽³⁶⁾. Inkubační doba chlamydiové konjunktivitidy je v průměru 3-5dnů, někdy ale trvá i déle. Inkluzní blenorhoea začíná většinou vodnatou sekrecí ze spojivkového vaku, otokem víček a zarudlými spojivkami. Klinický obraz je různě závažný. Přibližně polovina dětí infikovaných matek se nakazí ⁽³⁵⁾.

1.2.2. Urogenitální infekce

1.2.2.1. Uretritida (zánět močové trubice) u mužů

Chlamydiová uretritida s mírně hnisavým výtokem je typická pro infekci muže *Ch. trachomatis* (sérovary D-K). Způsobuje asi 60% uretritid u mužů a není vzácná. Příznaky infekce jsou často nenápadné, takže většina infekcí zůstává nezjištěna. To napomáhá dalšímu šíření nákazy. Inkubační doba při nákaze chlamydiemi je 7-14 dní. Hlavním příznakem při chlamydiové uretritidě je bolestivé močení a čirý až bělavý výtok před prvním ranním močením. Po 10-20 dnech (po inkubační době) se objevuje pálení při močení a nažloutlý výtok různé intenzity. Příznaky se někdy velmi podobají lehčímu průběhu kapavky ⁽³⁸⁾.

1.2.2.2. Cervicitis (zánět děložního hrdla) u žen

Ch. trachomatis (sérovary D-K) způsobují u žen cervicitis. Infekce může být příznaková (potíže při močení, bolesti v podbřišku), ale i bezpříznaková (to bývá asi u 70% žen). Komplikace neléčené infekce mohou vést až k závažným gynekologickým zánětům s následným rizikem mimoděložního těhotenství. Předpokládá se i možný vliv chlamydií na předčasný porod nebo porod dětí s nízkou porodní váhou. Proto je potřeba správná léčba makrolidovými antibiotiky či chemoterapeutiky se specifickým dávkováním ⁽³⁸⁾.

1.2.2.3. Lymphogranuloma venereum

Lymphogranuloma venereum - nemoc Nicolas-Favreova nebo též „pátá nemoc“. Jde o onemocnění pohlavní, převážně u obyvatel tropického a subtropického pásma. U nás se nevyskytl již od roku 1991, ale patří do seznamu nemocí na něž se vztahují zákonná opatření boje proti sexuálně přenosným chorobám. Způsobují ho sérotypy L-1, L-2, La-2, L-3 *Ch. trachomatis*. Tyto sérotypy mají ovšem vyšší invazivitu. Jsou považovány některými autory za zvláštní biotop: označení – biovar lymphogranuloma venereum. Hlavními

příznaky onemocnění jsou zvětšené mízní uzliny na genitáliích, zánět spojivek a lymfadenopatie. Toto onemocnění má 3 stádia projevu:

- I. Nebolestivý puchýřek nebo ulcerace (obvyklejší nález) – za 1-2 týdny po nákaze
- II. Zduření mízních uzlin v třísle, obvykle doprovázeno horečkou a zimnicí za další 1 týden. U žen častěji asymptomaticky!
- III. Anogenitální syndrom (rozsáhlý destruktivní zánět genitálu a konečníku s následným zjizvením). Vyskytuje se u neléčených osob, častěji žen⁽³⁸⁾.

1.2.2.4. Reiterův syndrom

Ještě do nedávna byl Reiterův syndrom považován za sexuálně přenosné onemocnění, které nemá známý původ. Toto onemocnění postihuje převážně muže a projevuje se touto trojicí obtíží: a) zánětem kloubů (artritida), b) zánětem močové trubice (uretritida), c) zánětem spojivek (konjunktivitida). Někdy se projevuje i kožními příznaky nebo zánětem střeva (enteritida). Nejnovější studie přišly na to, že příčinou jsou chlamydie⁽³⁸⁾. Probíhající infekce může zhoršovat spermiologické parametry⁽²⁵⁾.

1.3. Léčba

Léčebným cílem chlamydiových infekcí je snaha předejít vzniku a rozvoji komplikací a eliminovat infekce⁽²⁶⁾. Strategie léčby spočívá v antiinfekční léčbě. Jejím základem je dvojitě optimalizovaná léčba (mikrobiologická diagnostika plus farmakologické parametry). Tato léčba vyžaduje, aby antibiotika dobře pronikaly nejen do tkání, ale hlavně do buňky – do endosomu (kde se chlamydie nacházejí), měly vysoké tkáňové koncentrace v místě infekce a vysoké koncentrace v infikovaných buňkách^(17, 22). Vynikající aktivitu proti *Ch. trachomatis* mají tetracykliny, makrolidy, azalidy, rifampicin a některé fluorované chinolony.

Dříve byla doporučená terapie infekcí urogenitálního traktu doxycyklinem po dobu 7 dní a alternativou byla léčba erytromycinem. Později bylo studiemí potvrzeno, že azitromycin v jedné dávce je stejně účinný jako 7 denní léčba doxycyklinem. V těhotenství jsou kontraindikovány doxycyklin a fluorované chinolony. Doporučená terapie novorozeneckých infekcí je terapie erytromycinem po dobu 10-14 dní v doporučených dávkách. Alternativou je klaritromycin nebo azitromycin, stejně jako u perinatálně získané chlamydiové pneumonie ⁽¹²⁾. Nezbytnou součástí při léčbě je také dodržování chráněného pohlavního styku, léčba sexuálních partnerů nebo úprava hygienických návyků partnerského páru ⁽²⁶⁾.

1.4. Laboratorní diagnostika

Principy diagnostiky chlamydiové infekce jsou prakticky shodné s detekcí jiných bakteriálních infekcí. Diagnostické metody umožňují: a) přímou vizualizaci bakterie v odebraných vzorcích barvením, b) průkaz protilátek sérologickými testy (nejlépe průkaz rostoucího titru protilátek v dvojici sér, akutním a rekonvalescentním), c) přímou izolaci bakterie z tkáně pacienta, d) detekci specifických chlamydiálních genů nebo antigenů. Při akutní infekci jsou chlamydie přítomny ve větším množství v odebraném vzorku, proto je mnohem lehčí prokázat symptomatickou infekci. Menší množství chlamydií v hlubších vrstvách tkáně je přítomno při chronické infekci ⁽²⁵⁾.

1.4.1. Klinický materiál

Pro diagnostiku infekcí je nezbytnou podmínkou správný odběr materiálu, jeho skladování a transport (ve speciálních odběrových médiích) ⁽²⁵⁾.

Stěry a výtěry. Pro průkaz chlamydií (u infekcích urogenitálního traktu a dýchacích cest) je třeba provést výtěry tak, aby bylo odebráno co nejvíce buněčného materiálu (epitelií) ⁽¹⁰⁾. Pro diagnostiku očních infekcí se odebírá stěr ze spojivek sterilním tamponem a stírá se vnitřní plocha dolního popřípadě

horního víčka. Doporučuje se použít dva tampóny, pokud se dělá výtěr z obou očí. Tampon se poté důkladně vytřepá nebo se ponoří do nádoby s transportním médiem (použije se po dohodě s laboratoří podle toho, jakou vyšetřovací metodu laboratoř používá) ^(32, 35).

Při infekci ženského nebo mužského urogenitálního traktu se vyšetřují stěry z močových trubice; u žen i z děložního čípku a vaginy, dohromady nebo zvlášť. Stěr se provádí suchým sterilním tamponem 2 hodiny před močením z hloubky 2-4 cm, aby se zachytilo dostatečné množství infikovaných buněk. Jedním tamponem se setře hlen z děložního krčku, druhým rotačním pohybem se provede ostrý stěr ^(10, 39). Dále se vyšetřují materiály z dolních cest dýchacích (bronchoalveolární laváže, aspiráty a sputa) pro diagnostiku respiračních onemocnění ⁽¹⁰⁾.

Sérum. Odebírá se pro stanovení protilátkové odpovědi organismu ⁽⁵⁾.

Moč a výtěr z močové trubice. Zpracovávají se při diagnostice urogenitálních onemocnění ⁽³¹⁾.

Sperma. Minimálně 200 μl ejakulátu je potřeba vyšetřit pro stanovení chlamydiové kontaminace spermatu. Vzorku se odebírá do sterilní zkumavky bez transportního média a spermicidních látek. Odběr by měl proběhnout 2 až 3 dny po poslední ejakulaci ⁽¹³⁾.

1.4.2. Přímý průkaz

1.4.2.1. Kultivace (na tkáňových kulturách)

Kultivace chlamydií je docela náročná. Chlamydie jsou citlivé k transportu, proto se materiál musí skladovat ve speciálních odběrových médiích při 4°C a do laboratoře transportovat do 24 hodin. Vyšetřování chlamydií provádí jen laboratoř, která je zařízená na práci s tkáňovými kulturami, jelikož chlamydie lze kultivovat jen na tkáňových kulturách a ještě ne na všech. Např. 48 hodin roste

Chlamydia trachomatis a poté se dále prokazuje barvením v tkáňové kultuře ^(25, 35). Vyšetřovaný materiál lze kultivovat na žloutkovém vaku kuřecího embrya, na buněčných kulturách (McCoy, HeLa), popř. ho očkovat do mozku, peritonea nebo nosu laboratorní myši ⁽¹¹⁾.

1.4.2.1.1. Tkáňové kultury

Za prvního uznávaného zakladatelem kultivace buněk je pokládán Ross Harrison, který v roce 1907 udržoval po několik týdnů malé fragmenty nervové tkáně medulární roury žabího embrya na koagulované žabí lymfě. Ale historicky první úspěšná explantace a následná kultivace lidských krevních buněk byla provedena již v roce 1886 ^(8, 19).

Viry se nemohou replikovat mimo hostitelskou buňku, proto se pěstují na tzv. tkáňových kulturách. Tkáňovou kulturu tvoří zvířecí buňky mnoha typů, které se za určitých podmínek mohou množit v umělém prostředí. Dnes jsou využívány jednovrstevné tkáňové kultury, které zlepšují kultivaci. Slouží nejen k pěstování virů, ale také k jejich zachycení (izolaci) a určování jejich vlastností. Biologickou aktivitu virů posuzujeme podle změn, ke kterým dochází u buněk v tkáňové kultuře (změna růstu, tvaru nebo množení nebo podle různého poškození buněk). Hovoříme tedy o tzv. cytopatickém efektu (důsledek působení některých virů na buňku). Lze je pěstovat i na kuřecích embriích ⁽¹⁴⁾.

Příprava tkáňových kultur

Prvotní je **stacionární kultura**. Ve stacionární kultuře se buňky pěstují na pevné podložce (př. sklo nebo speciálně upravený polystyren pro tkáňové účely). Při optimálních podmínkách (odstraňování toxických zplodin metabolismu pravidelnou výměnou kultivačního média, stabilní tenze CO₂) buňky během 2-3 dní vytvoří tzv. monolayer (jednovrstevný porost) ⁽⁷⁾.

Primokultura (primární buněčná kultura). Buňky jsou zde pěstované mimo organismus *in vitro*. Primokultura se skládá z buněčné suspenze, která se získala rozvolněním odebrané tkáně (čerstvě izolované z organismu). Obsahuje ale směs různých typů buněk, které se musí např. protilátkami specificky rozpoznávající požadovaný typ buněk imobilizovat. Opakovaným promytím se odstraní nežádoucí buňky. Při přípravě suspenze jsou buňky poškozeny buď enzymatickým nebo mechanickým rozvolněním z tkáně. Podíl mrtvých buněk je vysoký, živé buňky činí 1-30%. Z počátku se v primokultuře buňky množí pomalu. Po 1-2 týdnech dorostou do souvislého monolayeru (tady se díky vlivu kontaktní inhibice růstu přestávají množit). Aby se dále množily, musejí být přesazeny do nové kultivační nádoby.

Diploidní buněčná linie. Vychází z primární kultury. Vznikají z buněk, které se v podmínkách *in vitro* začaly rozmnožovat. Z počátku buňky odpovídají morfologicky i funkčně buňkám původní tkáně. I počet chromozómů zůstává diploidní. Rychle se množí. K vytvoření monolayeru dochází během 2 – 3 dní. Rychlost proliferace ale postupně klesá, až nakonec (po 40-50 děleních) linie zanikne.

Stabilizovaná buněčná linie. Stane se, že buněčná linie neuhyne, vyskytnou se v ní transformované buňky se změněnými vlastnostmi a ty se stanou základem pro stabilizovanou (heteroploidní - numerická změna není ve všech buňkách stejná) buněčnou linii. Tato linie ztrácí orgánovou specifitu, má vysoký podíl aneuploidních buněk s odchylným počtem i morfologií chromozómů. Mají vlastnosti nádorových buněk, takže vykazují pozitivní testy malignity. Snáze rostou v suspenzi, ve stacionární kultuře mohou růst ve více vrstvách. Tyto transformované buňky lze pěstovat prakticky neomezeně dlouho *in vitro* (i řadu let), protože mají neomezený růstový potenciál a stávají se proto tzv. „nesmrtelnými“ buňkami^(7, 24).

1.4.2.2. PCR (průkaz nukleové kyseliny)

Metoda PCR nebo-li polymerázová řetězová reakce slouží k namnožení úseků DNA. První krok začíná tepelnou denaturací DNA vlivem vysoké teploty (okolo 95°C) na jednoduché řetězce. Další fáze je ochlazení vzorku na 50 – 60°C, dochází k navazování primerů na komplementární 3' konce cílové DNA. Ve třetím kroku je DNA polymeráza (izolované z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horských minerálních pramenech) napojena na řetězec, která prodlužuje vlákna DNA směrem od obou primerů, ve směru od 5' konce ke 3' konci při 72°C.

Po dokončení syntézy se zkumavka s PCR reakcí zahřívá opět na 95 °C, dochází k denaturaci nově vytvořených DNA duplexů a poté se celý cyklus opakuje. Opakování cyklů vede k rychlému namnožení cílové DNA ⁽⁴⁾. V současné době nejpoužívanější a nejcitlivější metoda ⁽³⁵⁾.

1.4.2.3. Průkaz Ag (přímou imunofluorescencí, ELISA nebo některou modifikací imunochromatografie)

Průkaz antigenu je nejméně technicky náročný, hlavně na transport materiálu, protože se neprokazují živé bakterie. Pokud jsou vzorky kvalitně odečteny, mají dobrou citlivost a specificitu, i když stále o 2-3 řády nižší, než jaké má kultivace ⁽³⁵⁾. Přímá imunofluorescence prokazuje na povrchu elementárních tělísek specifické antigeny pomocí monoklonálních protilátek značených fluoresceinem. Hodnotí se mikroskopicky. Z IF (přímé imunofluorescence) lze zjistit, že byl odběr špatný. Posuzujeme totiž celý preparát a je vidět, zda bylo odebráno dost buněk ⁽¹⁷⁾.

1.4.3. Nepřímý průkaz

Nepřímá vyšetření protilátkové odpovědi jsou založena na průkazu rodově nebo druhově specifických protilátek třídy IgA, IgM nebo IgG (Toršová 2004). Do průkazu rodově specifických protilátek patří např. dříve používaná KFR (komplement fixační reakce, která nerozlišila třídy protilátek) nebo některé metody ELISA, které používají jako antigen LPS (chlamydiový lipopolysacharid). Průkaz protilátek druhově specifický má zlatý standard MIF (mikroimunofluorescence), ale existuje řada souprav typu ELISA, které nejsou standardizované, ale některé dávají výsledky srovnatelné s MIF^(1, 12, 34).

Metodou MIF (mikroimunofluorescence) se stanovují druhově specifické protilátky proti antigenům vnější membrány (major outer membrane protein, MOMP), ale ty nastupují během infekce až později. Jsou druhově specifické a mohou rozlišit *Ch. trachomatis*, *Ch. psittaci* a *Ch. pneumoniae*⁽¹²⁾.

Pro posouzení tvorby protilátek je vhodné udělat první odběr v počátku onemocnění a druhý tak za 2-3 týdny. Je dobré doplnit vyšetření vzorkem séra za 4-6 týdnů od počátku onemocnění. Potvrzením akutní fáze infekce jsou prokázané protilátky IgM. Pro prodělanou infekci a v případě vysoké pozitivivity jako ukazatel akutní fáze svědčí protilátky IgG. Protilátky IgA nám značí chronický průběh onemocnění nebo určitou míru infekce. Při reinfekci se nejprve reaktivují IgG, později IgA, velmi vzácně i IgM. Doporučuje se během onemocnění vyšetřit rodově i druhově specifické protilátky⁽²⁷⁾.

1.4.3.1. ELISA (průkaz protilátek IgG, IgA, IgM)

Testy ELISA jsou méně náročné na odbornost laboratoře a velmi jednoduché na vyhodnocení (Velemínský et al. 2005). Metoda s podstatou reakce antigen-protilátka. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je vlastně speciálním druhem EIA testů (enzymoimunoanalýza), což jsou analytické metody, které pomocí imunochemické reakce s enzymy (enzymovými konjugáty) umožňují

stanovit koncentraci antigenu nebo protilátky v neznámém vzorku. ELISA je buďto heterogenní nekompetitivní EIA (tzv. sandwich) nebo heterogenní kompetitivní EIA.

Princip je takový, že protilátka proti vyšetřovanému antigenu je navázána na stěnu mikrotitrační destičky o 96 jamkách. Poté se přidává naředěný vzorek, který obsahuje antigen a nechá se inkubovat. Po inkubaci se nenavázané složky odmyjí a k prokazovaným látkám, které se zachytily na antigenu, se přidá druhá protilátka s navázaným enzymem (konjugát). Po opětovné inkubaci a odmytí nadbytečné protilátky s enzymem se přidá substrát a probíhá enzymem katalyzovaná reakce. Vzniklá barevná reakce se měří fotometricky. Výhoda ELISA testů je dostatečná specifita, citlivost a opakovatelnost⁽⁴⁾.

1.4.3.2. Nepřímá imunofluorescence (mikroimunofluorescence-MIF ve třídách IgG, IgA, IgM)

Slouží ke stanovení protilátek v séru namířených proti jednotlivým druhům chlamydií. Na sklíčka jsou nakapána a fixována opračovaná elementární tělíska 3 druhů chlamydií (*Ch. trachomatis*, *Ch. pneumoniae*, *Ch. psittaci*). Na to se nanáší ředěné sérum pacienta. Po inkubaci se opláchnou a specifické protilátky zůstanou navázané. Na takto opračované sklíčko se nanáší konjugát, protilátka proti lidskému buď IgG nebo IgA nebo IgM značená FITC (fluorescein isothiocyanát) a znovu se inkubuje.

Tam, kde jsou přítomny protilátky příslušné třídy, se značená protilátka naváže a v dalším promytí se už neodmyje. Kde nedošlo k navázání protilátky, je přebytečný konjugát odmyt. Sklíčka se pak prohlížejí v mikroskopu s fluorescencí o příslušné vlnové délce. V mikroskopu jsou pozitivní nálezy vidět jako zeleně zářící elementární tělíska. Negativní vzorek nesvítí⁽⁴⁾.

2. Cíl práce

Cíle mé bakalářské práce byly:

- Vyzkoušet kultivační metodiku diagnostiky *Chlamydia trachomatis* a zhodnotit výsledky podle jednotlivých kritérií (věk, diagnóza) za určité období.
- Výsledky porovnat s literárními údaji.

3. Metodika

3.1. Charakteristika souboru

Laboratorní část mé bakalářské práce jsem prováděla v centrální laboratoři v nemocnici České Budějovice, a.s. v laboratoři virologie za odborného dohledu MUDr. Evy Žampachové. Výzkum trval od října do začátku prosince roku 2011. Za tu dobu jsem získala 159 výsledků, které jsem hodnotila třemi kategoriemi: pozitivní, negativní a nelze hodnotit (= to znamená, že vzorky byly přerostlé bakteriemi nebo kvasinkami a nebylo možné je vyhodnotit).

Cílem mé práce bylo vyzkoušet si kultivační metodu, která je jednou z metod průkazu chlamydií. Laboratoř virologie v ČB je zařízená na práci s tkáňovými kulturami, na kterých je kultivace prováděna.

Kultivuje se zde na buněčné linii BGM buněk, které do ČR byly dovezeny ze Švýcarska (z Bernu) prof. T. Krechem. Ve světě se téměř nepoužívá. Na tomto pracovišti se tato buněčná linie osvědčila, proto ji používají již od roku 1985, kdy ji dostali ⁽³⁷⁾.

Vyšetřovaný materiál byl odebrán na kožním, gynekologickém a urologickém oddělení. Na tyto oddělení poskytuje laboratoř virologie speciální transportní média, do kterých je odebraný materiál vložen a transportován do 24 hodin zpět na oddělení virologie. Do transportu je nutno uchovávat médium se vzorkem v chladničkové teplotě. Každý vzorek musí mít přiloženou, řádně vyplněnou žádanku s identifikací pacienta a požadovaného vyšetření. Materiál z oddělení nemocnice ČB do laboratoře snáší sanitáři v termoboxech a z terénních míst je svážen svozovými řidiči v boxech se zajištěnou teplotou.

Na příjmu, po zkontrolování identifikace vzorku s příslušnou žádankou, dostane každý vzorek své ID číslo (podle zvyklosti každé laboratoře). Toto číslo se napíše na zkumavku i na tu pracovní, aby později nedošlo k záměně.

Očíslovaný vzorek je z příjmu přenesen na pracoviště, kde jej laborantka dále zpracovává (tj. rozočkovává na tkáňové kultury, centrifuguje, inkubuje atd.)

3.2. Zpracování materiálu na kultivaci

Má práce v laboratoři začala již příchodem materiálu, kdy jsem kontrolovala přinesený materiál s příslušnými žádankami a přiřazovala ID číslo laboratoře za odborného dohledu. Přinesené materiály byly povětšinou stěry (u žen z uretry nebo cervixu, u mužů z uretry). Vše přineseno v transportním médiu. Jelikož nejsem zdravotnický pracovník, byly přijmuté vzorky alikvotovány a tento alikvot byl poskytnut pro můj samostatný výzkum.

Použité reagenty:

- 5% E-MEM médium – uchováváme při +4°C
- Suspenze BGM buněk v 5% E-MEM médium
- Médium s cykloheximidem – 125ml 5% E-MEM média + 0,1ml roztoku cykloheximidu – uchováváme při +4°C
- Zásobní roztok cykloheximidu – 10mg cykloheximidu + 8ml dest. neionizované H₂O – uchováváme při +4°C

V laboratoři si laborantky každé 2 dny dopředu připravují tkáňové kultury, na které poté rozočkují přijmutý materiál. V této laboratoři se připravuje 2-3ml hustější suspenze BGM buněk (velice citlivé než buňky McCoy) do zkumavek s plochým dnem s vloženým kulatým krycím sklíčkem, nechá se inkubovat ve svislé poloze 24hodin v termostatu při 37°C a dále se nechává při pokojové teplotě – nejdéle 48hodin.

Ze zkumavek s nasazenými BGM buňkami jsem odsála médium. Odebraný vzorek (aliquot) jsem rozočkovala do dvou předem označených zkumavek, které jsem následně zakryla alobalovým kloboučkem. Nechala jsem

centrifugovat 40 minut při 3000 otáčkách a 20°C. Po centrifugaci jsem odsála médium a případně i okem viditelnou usazeninu buněčné drti a erytrocytů, poté jsem do zkumavek přidala 2-3ml 5%E-MEM média s cykloheximidem (udržovací médium pro chlamydie). Zkumavku jsem zazátkovala a vše se nechalo 48 hodin inkubovat při 37°C ve svislé poloze.

3.3. Modifikované barvení dle Macchiavella

Použité reagenty:

- PBS – sterilní roztok
- Metanol
- Solakryl
- Bazický fuchsin – 1ml základního roztoku fy IMUNA + 19ml dest.H₂O (uchovávat při +4°C)
- Metylénová modř – 250mg + 25ml dest. H₂O (uchovávat při +4°C)
- Kyselina citronová – 0,25% roztok – 250mg + 100ml dest.H₂O – vždy čerstvý!

Po 48 hodinách jsem slila kultivační médium a vzorek jsem opláchla sterilním PBS pufrem. Odlila jsem zbylou tekutinu a fixovala metanolem 5-10 min. Poté jsem vyjmula sklíčka ze zkumavek a nechala je oschnout. Na označená podložní skla jsem kápnula solakryl a hladkou nenarostlou stranou jsem přilepila sklíčko z příslušné zkumavky. Nechala jsem zaschnout – minimálně 30 minut a následně jsem je barvila (modifikovaným barvením dle Macchiavella).

Princip barvení dle Macchiavella je ten, že chlamydie obtížně přijímají barvivo, ale pokud ho přijmou, tak ho obtížně vyplavují. Proto se barví dlouho koncentrovanou barvou.

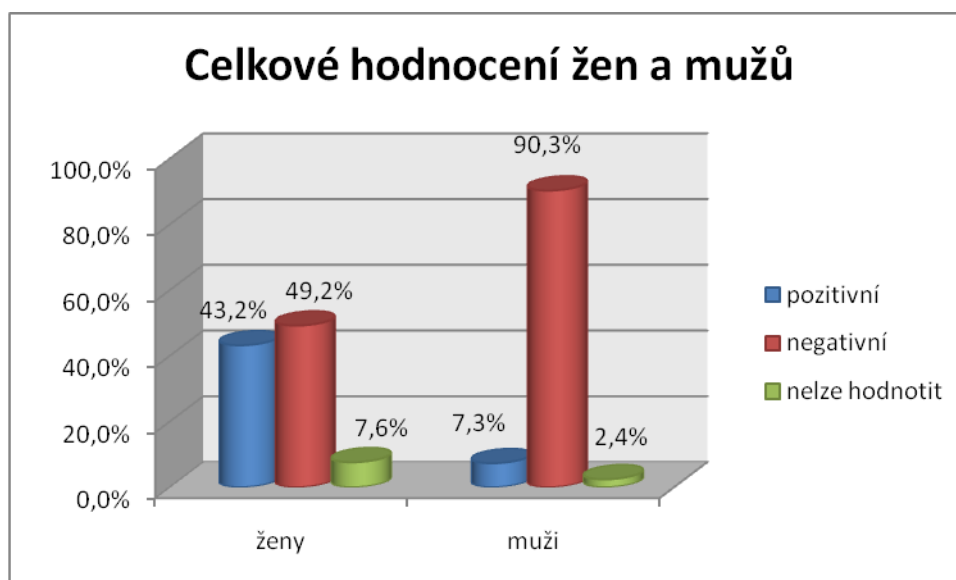
Nejprve jsem vše barvila 5-6 minut pracovním roztokem bazického fuchsinu, aby se zbarvily buněčné inkluze (= vakuoly, naplněné chlamydiovými tělísky). Poté jsem to odbarvila dle potřeby v 0,25% roztoku kyseliny citronové, který odbarvil ostatní struktury a chlamydiové inkluze si barvu podržely. Opláchla jsem vše destilovanou H₂O a dobarvila roztokem metylénové modři 15-20 vteřin, který obarví ostatní struktury a potlačí neodbarvené pozadí. Tím se zvýrazní červeně obarvené inkluze, pro lepší viditelnost pod světelným mikroskopem. Znovu jsem vše opláchla a promyla v destilované H₂O a následně nechala oschnout. Ochlá podložní sklíčka jsem odečítala pod optickým mikroskopem Olympus BX40 (objektiv 100x s imerzí, při zvětšení 1000x). Typické inkluze vidíme na obr.2, 3.

Nejednoznačné vzorky jsem ověřovala technikou barvení monoklonální protilátkou proti *Chlamydia trachomatis* –fy. BIO-RAD (tam pozitivita výrazně fluoreskovala pod fluorescenčním mikroskopem, viz. obr.4). Tato technika barví inkluze chlamydií a je zcela specifická, protože protilátka je připravována tak, že se váže na proteiny membrány chlamydie. Je ale nákladnější a dražší.

4. Výsledky

Během období od 18.10. do 5.12. roku 2011 jsem vyšetřila celkem 159 vzorků. 118 vzorků (74,2%) pocházelo od žen, z toho 51 vzorků (43,2%) bylo pozitivních, 58 vzorků (49,2%) bylo negativních a 9 vzorků (7,6%) nelze hodnotit (= vzorek byl přerostlý bakteriemi nebo kvasinkami). 41 vzorků (25,8%) pocházelo od mužů, z toho 3 vzorky (7,3%) byly pozitivní, 37 vzorků (90,3%) bylo negativních a 1 vzorek (2,4%) nelze hodnotit (= vzorek byl přerostlý bakteriemi nebo kvasinkami).

(Graf č.1: Celkové hodnocení 159 vzorků žen a mužů)

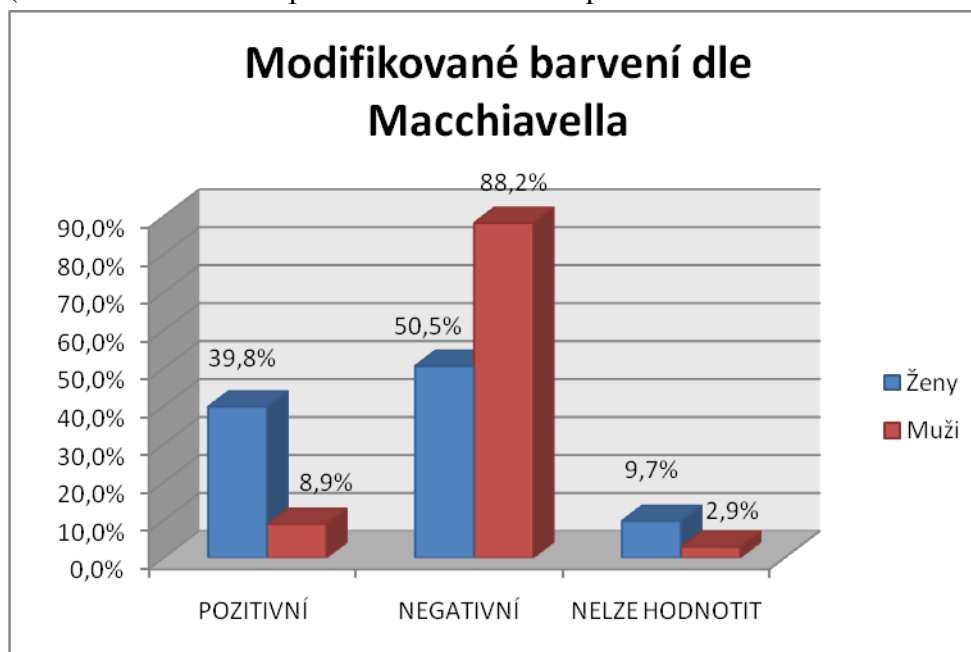


Tyto vzorky jsou dále rozděleny podle typu barvení, které bylo po kultivaci následně prováděno. Ze 159 vzorků bylo 127 vzorků (79,9%) barveno modifikovaným barvením dle Macchiavella a 32 vzorků (20,1%) barveno monoklonální protilátkou proti *Chlamydia trachomatis*.

(Tabulka č.2 : Barvení technikou dle Macchiavella)

Modifikované barvení dle Macchiavella				
VZORKY	POZITIVNÍ	NEGATIVNÍ	NELZE HODNOTIT	CELKEM
Celkem	40	77	10	127
Ženy	37	47	9	93
Muži	3	30	1	34

(Graf č.2: Přehled procentuálního zastoupení u barvení dle Macchiavella)



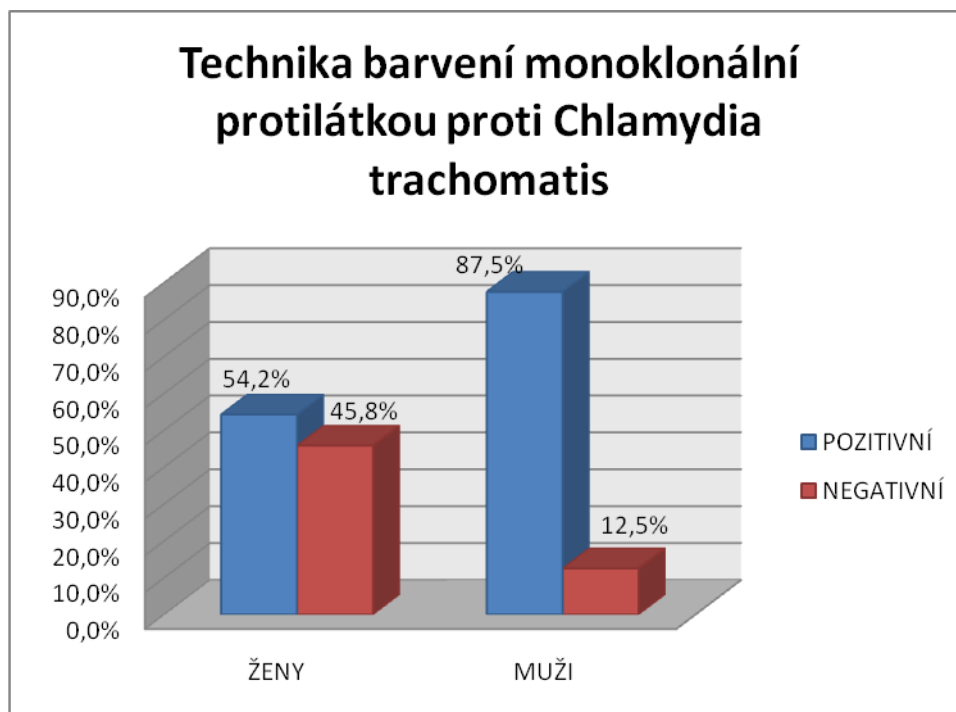
Poznámka: Na grafu je znázorněno procentuální zastoupení u modifikovaného barvení dle Macchiavella. Celkem bylo obarveno 127 vzorků (75%). 93 vzorků

(73,2%) žen, z toho bylo pozitivních 37 vzorků (39,8%), negativních 47 vzorků (50,5%) a 9 vzorků (9,7%), které nelze hodnotit (vzorky byly přerostlé bakteriemi nebo kvasinkami). 34 vzorků (26,8%) mužů, z toho byly pozitivní 3 vzorky (8,9%), negativní 30 vzorků (88,2%) a 1 vzorek (2,9%), který nelze hodnotit (= vzorek byl přerostlý bakteriemi nebo kvasinkami).

(Tabulka č.3: Barvení monoklonální protilátkou proti *Chlamydia trachomatis*)

Technika barvení monoklonální protilátkou proti <i>Chlamydia trachomatis</i>			
VZORKY	POZITIVNÍ	NEGATIVNÍ	CELKEM
Celkem	14	18	32
Ženy	13	11	24
Muži	1	7	8

(Graf č.3: Procentuální zastoupení u barvení monoklonální protilátkou)



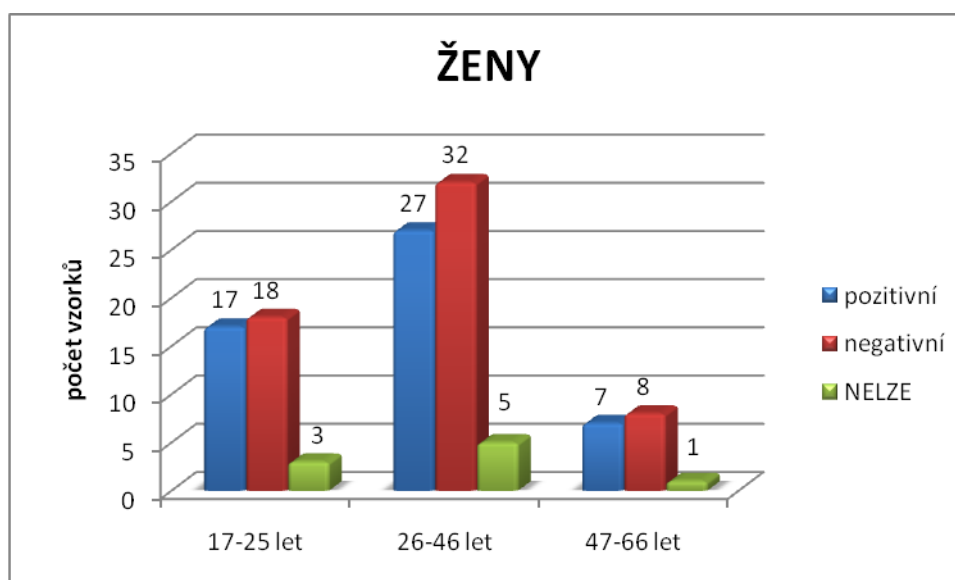
Poznámka: Graf znázorňuje procentuální zastoupení u barvení monoklonální protilátkou proti *Chlamydia trachomatis*. Celkem bylo monoklonální protilátkou obarveno 32 vzorků. 24 vzorků (75%) žen, z toho 13 vzorků (54,2%) bylo pozitivních a 11 vzorků (45,8%) bylo negativních. 8 vzorků (25%) mužů, z toho bylo 7 vzorků (87,5%) pozitivních a 1 vzorek (12,5%) negativní.

Dále jsem výsledky zhodnotila podle věku. Vzorků žen jsem měla k dispozici z celkového počtu 159 vzorků 118 (74,2%). Ženy byly ve věku 17-66 let. Rozdělila jsem je do 3 skupin ve věku 17-25 let, 26-46 let a 47-66 let.

(Tabulka č.4: Rozdělení 118 vzorků žen dle věku)

	17-25 let			26-46 let			47-66 let		
Hodnocení	Poz.	Neg.	NELZE	Poz.	Neg.	NELZE	Poz.	Neg.	NELZE
Ženy	17 (44,7%)	18 (47,4%)	3 (7,9%)	27 (42,2%)	32 (50%)	5 (7,8%)	7 (43,8%)	8 (50%)	1 (6,2%)

(Graf č.4: Zastoupení vzorků žen hodnocené dle věku)



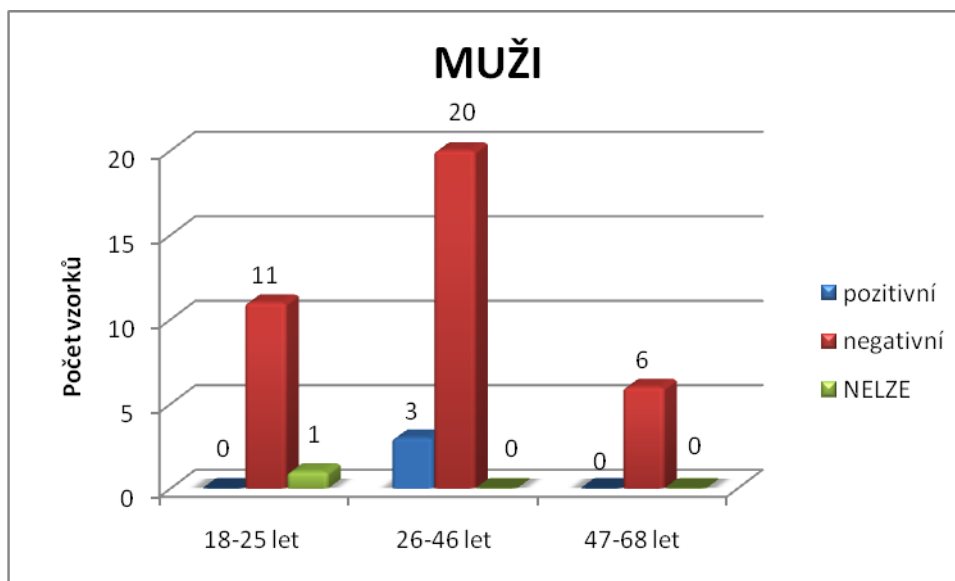
Poznámka: Na tomto grafu je vidět procentuální zastoupení hodnocení dle věku u žen. Celkem bylo 118 vzorků (74,2%) rozdělených do 3 kategorií věku. Ve věku 17-25 let bylo hodnoceno 38 vzorků (32,2%), z toho 17 vzorků (44,7%) bylo pozitivních, 18 vzorků (47,4%) negativních a 3 vzorky (7,9%) nelze hodnotit. Ve věku 26-46 let bylo hodnoceno 64 vzorků (54,2%), z toho 27 vzorků (42,2%) bylo pozitivních, 32 vzorků (50%) negativních a 5 vzorků (7,8%) nelze hodnotit. Ve věku 47-66 let bylo hodnoceno 16 vzorků (13,6%), z toho 7 vzorků (43,8%) bylo pozitivních, 8 vzorků (50%) negativní a 1 vzorek (6,2%) nelze hodnotit.

Vzorků mužů jsem měla k dispozici 41 (25,8%) z celkového počtu 159 vzorků. Muži byli ve věku 18-68 let. Rozdělila jsem je do 3 skupin ve věku 18-25 let, 26-46 let a 47-68 let.

(Tabulka č.5: Rozdělení 41 vzorků mužů dle věku)

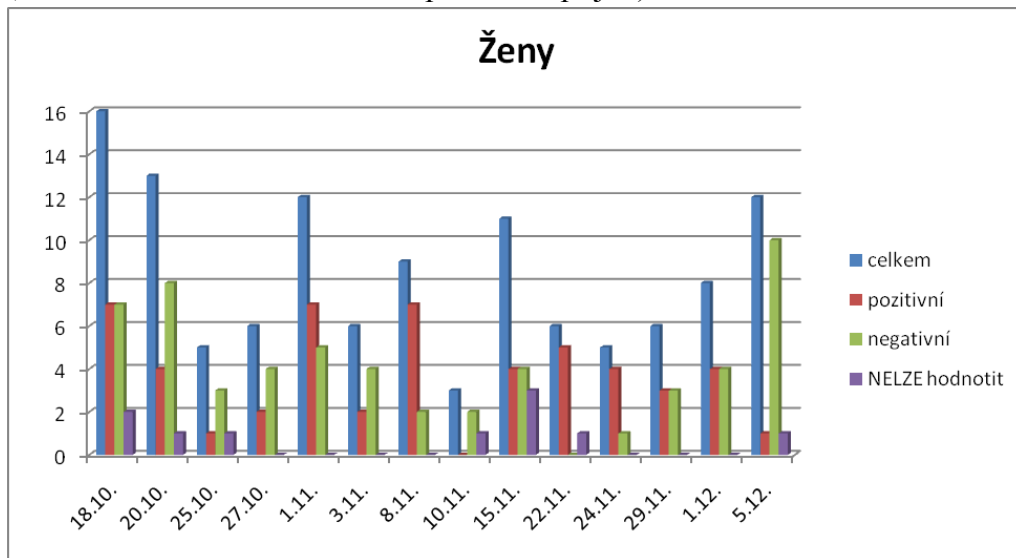
	18-25 let			26-46 let			47-68 let		
Hodnocení	Poz.	Neg.	NELZE	Poz.	Neg.	NELZE	Poz.	Neg.	NELZE
Muži	0 (0%)	11 (91,7%)	1 (8,3%)	3 (13%)	20 (87%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)

(Graf č.5: Zastoupení vzorků mužů hodnocené dle věku)



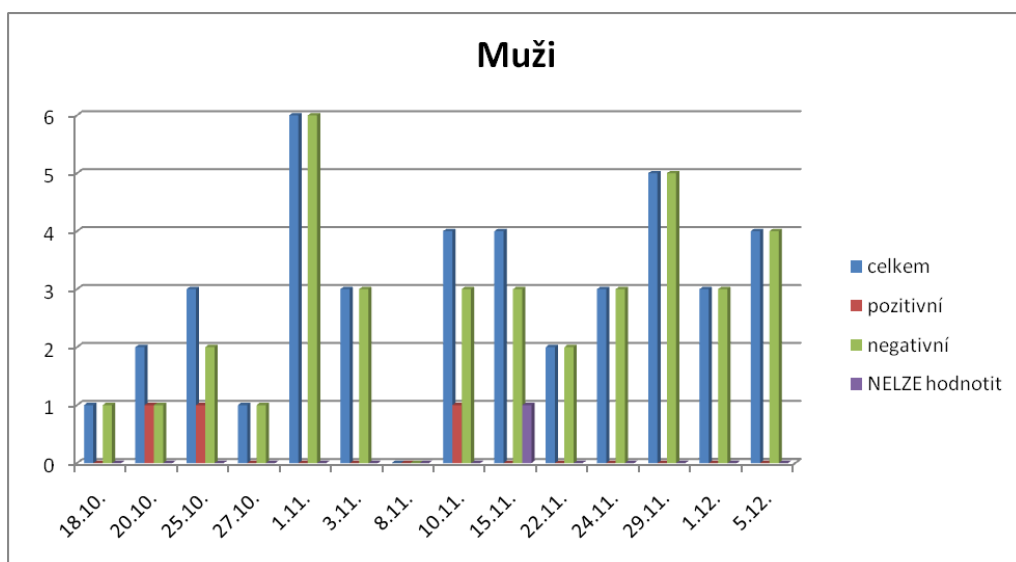
Poznámka: Na tomto grafu je vidět procentuální zastoupení hodnocení dle věku u mužů. Celkem bylo 41 vzorků (25,8%) rozdělených do 3 kategorií věku. V věku 18-25 let bylo hodnoceno 12 vzorků (29,3%), z toho žádný vzorek nebyl pozitivní, 11 vzorků (91,7%) bylo negativní a 1 vzorek (8,3%) nelze hodnotit. Ve věku 26-46 let bylo hodnoceno 23 vzorků (56,1%), toho 3 vzorky (13%) byly pozitivní a 20 vzorků (87%) bylo negativních. Žádný vzorek v této věkové skupině nebyl hodnocen kategorií nelze hodnotit. Ve věku 47-68 let bylo hodnoceno 6 vzorků (14,6%) a všechny byly negativní (100%).

(Graf č.6: Rozdělení vzorků žen podle dnů přijetí)



Poznámka: Tento graf zobrazuje dny, kdy byly přijaté vzorky žen, jejich celkový počet a následné hodnocení 3 kategoriemi.

(Graf č.7: Rozdělení vzorků mužů podle dnů přijetí)



Poznámka: Graf znázorňuje dny, kdy byly přijaté vzorky mužů, jejich celkový počet a následné hodnocení 3 kategoriemi.

5. Diskuze

Chlamydia trachomatis je nejčastější sexuálně přenášený bakteriální patogen na světě. Podle odhadů WHO (World Health Organization) vzniká každý rok minimálně 500 milionů nových případů onemocnění pohlavním stykem. Asi 90 milionů těchto onemocnění je vyvolané chlamydiemi, jak uvádí Poršová⁽³⁰⁾.

Díky vysoké prevalenci asymptomatických urogenitálních chlamydiových infekcí zavedlo CDC (Centers for Disease Control and Prevention) v Atlantě roku 1993 „Doporučení pro screening infekcí *Ch. trachomatis*“. Jednou ročně by měli být sexuálně aktivní ženy do 20-25let, jestliže mají nového partnera či více partnerů, ženy s klinickou cervikální infekcí a všechny těhotné ženy testovány. Zkušenosti ze skandinávských států a USA později ukázaly, že zavedením těchto programů došlo nejen ke snížení prevalence infekce v populaci, ale i ke snížení mimoděložních těhotenství o 50 %⁽¹⁸⁾.

K diagnostice chlamydií se může použít cytologie, izolace na buněčných kulturách, detekce antigenu, hybridizace nukleových kyselin, amplifikační metody, sérologie. Cytologická diagnostika je dnes nahrazována senzitivnějšími a specifitějšími molekulárně biologickými metodami např. PCR. Podobně je nahrazována i izolace na buněčných kulturách. V současné době se nejvíce používá metoda PCR a průkaz antigenu. Sérologie je založena na detekci rodově a druhově specifických protilátek. KFR (komplement fixační reakce), detekující protilátky proti skupinovému antigenu (př. LPS), je nahrazena rodově specifickým testem ELISA a druhově specifickým MIF (mikroimunofluorescenčním) testem. Ale např. specifita MIF proti *Ch. pneumoniae* nebyla ve studiích recentně potvrzena⁽¹²⁾.

Data o nemocnosti vyvolané chlamydiemi nejsou z České Republiky známa, protože kromě trachomu a lymfogranuloma venereum nepodléhají povinnému hlášení. Ale celosvětově budou odhadované počty infikovaných

jedinců *Ch. trachomatis* pravděpodobně vyšší, jak udává Matoušková ⁽²⁶⁾. Infekce způsobené chlamydiemi představují zhruba 50 % všech urogenitálních nákaz ⁽¹⁶⁾.

Podle Matouškové ⁽²⁶⁾ dostupná literatura uvádí, že prevalence sérotypů D-K *Ch. trachomatis* (způsobující onemocnění urogenitálního traktu) u dospívajících se pohybuje mezi 7 až 30 %. V USA je infikováno asi 4,2 % populace ve věku 18 až 26 let, ve Velké Británii 2,1 % a v Číně přibližně 2,5 % populace ve věku 20 až 64 let.

Citlivost kultivace vzhledem k ostatním metodám je hodnocena různě, od 75% u mužů, 85% u žen, jak uvádí Kobliha ⁽²¹⁾ až po 95,8% u mužů a 100% u žen, jak uvádí Kluytmans ⁽²⁰⁾. Ve studii Kluytmans ⁽²⁰⁾ srovnávali rychlé testy s citlivostí kolem 60% u mužů, 62% u žen, PCR s citlivostí 79% u mužů, 87% u žen a kultivaci 95% u mužů, 100% u žen. Jako nejspolehlivější technika pro detekci *Ch. trachomatis* tady vyšla kultivace. Chlamydie se dají vyšetřovat různými metodami. V Centrálních laboratořích Nemocnice České Budějovice a.s. v laboratoři virologie se chlamydie nejčastěji vyšetřují právě kultivační metodou na tkáňových kulturách. Tato metoda byla zvolena i pro mou výzkumnou část bakalářské práce.

Z celkového počtu 159 vzorků pocházelo 118 vzorků (74,2%) od žen, z toho 51 vzorků (43,2%) bylo pozitivních. 41 vzorků (25,8%) pocházelo od mužů, z toho 3 vzorky (7,3%) byly pozitivní, jak je vše vidět na grafu č.1. Jde o osoby s potížemi, tedy klinicky manifestní případy, případně sexuální partnery pozitivních pacientů. Námi vyšetřovaní pacienti byli z různých pracovišť, s dlouhodobými nebo recidivujícími potížemi.

Většina údajů v zahraničních materiálech, ze kterých čerpají i naši autoři je dělaná na STD (Sexually transmitted disease) klinikách, což jsou kliniky pro sexuálně přenosné choroby. Klientela těchto klinik jsou hlavně mladší muži a ženy, kteří mají akutní infekci a klinické obtíže nebo jsou z nějakého důvodu

zařazení do screeningových programů. U nás nejsou STD kliniky (na dermatologii nejsou příliš pacienti zvyklí o těchto chorobách mluvit, spíše se za ně stydí), takže se často primární péče o pacienty s chlamydiovou infekcí poskytuje na gynekologii.

Povědomí o problému i možnosti gynekologů jsou u nás pravděpodobně menší, proto máme méně mladých a velmi mladých pacientek vyšetřených. Věkově nejmladší vzorek byl od 17 -leté pacientky. Pozitivita ve věkové skupině 17-25 let činila 44,7% z 38 přijatých vzorků, jak ukazuje tabulka č.4 a graf č.4. Pak se diagnóza posouvá do vyššího věku, kdy už se velmi obtížně léčí. Proto bývá ve větším procentu selhání léčby a recidivující infekce, jak ve své práci uvádí Žampachová ⁽³⁷⁾. Ve věkové skupině 26-46 let činila pozitivita 42,2% ze 64 přijatých vzorků, jak je znázorněno v tabulce č.4 a grafu č.4. Jde většinou o symptomatické pacientky, které měly gynekologické potíže a buď nikdy nebyly vyšetřeny a léčeny a nebo mají chronickou infekci, která se léčí velmi obtížně a má sklony recidivovat.

Dvořáková ⁽⁹⁾ udává, že největší nemocnost u žen je ve věku 16-19 let. Při tomto výzkumu byla největší nemocnost prokázána ve věku 26-46 let. Největší nemocnost u mužů je podle Dvořákové ⁽⁹⁾ ve věku 20-24 let. Tabulka č.5 a graf č.5 ukazuje, že námi provedený výzkum ve věkové skupině 18-25 let neprokázal ani jednu pozitivitu u mužů, všechny vzorky vyšly negativně. Pouze ve věkové skupině 26-46 let vyšla pozitivita 13%, což jsou pouze 3 vzorky z 23 přijatých vzorků symptomatických pacientů. Ostatní vzorky vyšly negativně. U mužů máme očekávané výsledky, u žen trochu jiné než jsme očekávali. Jedním z důvodů může být i soubor odesílajících lékařů. Vzorky odesílají nejen gynekologové, ale i revmatologové a jiné odbornosti, kteří řeší problémy chronických zánětů.

Ve výsledcích nejde o frekvenci infekce v populaci, protože nebyli vyšetřováni zdraví jedinci a nešlo o reprezentativní vzorek. Rozdíl je také daný velikostí souborů a tím, že u mužů se méně často projevuje chronická infekce. Velmi málo autorů se soustřeďuje na problémy chronických infekcí a podle těchto výsledků je vidět, že je to podceněný problém.

6. Závěr

Během vypracování své bakalářské práce jsem se seznámila s kultivační metodou na tkáňových kulturách. Technicky jsem metodiku zvládla, přesto že jsem pracovala pod dozorem (nejsem zdravotnický pracovník) a naučila jsem se základně odečítat preparáty z kultivace. Vyšetřeno touto metodou bylo 159 vzorků. 118 vzorků od žen a 41 vzorků od mužů. Zhodnocení je jak v absolutních číslech, tak v procentech. Statistické hodnocení není provedeno, protože nebyl k dispozici srovnatelný kontrolní soubor zdravých osob.

Kultivace je vyhovující metoda, dostatečně citlivá. Záchyty odpovídají předpokládaným výsledkům, jen je znatelný posun záchytu u žen ve vyšším věku 26-46 let a to 42,2% z celkových 64 přijatých vzorků (viz diskuse). Práce poskytuje informace o metodikách stanovení *Chlamydia trachomatis* a může tak sloužit jako zdroj informací pro pracovníky v diagnostických laboratořích, studenty zdravotnických oborů a další zájemce o danou problematiku.

7. Klíčová slova

Chlamydia trachomatis

chlamydie

kultivace

tkáňové kultury

8. Seznam použitých zdrojů

- 1) BAČINA, A., BUDAYOVÁ, E., VOKATÁ, S. *KFR (komplement fixační reakce)* [online]. Hradec Králové [cit. 2013-04-19] Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/KFR-komplement-fixacni-reakce.aspx>
- 2) BARTONÍČKOVÁ, K. Chlamydiové infekce z pohledu gynekologa. *Practicus*, 2008, roč.7, č. 8, s. 28-33, ISSN 1213-8711.
- 3) BARTOŠOVÁ, D., HUSA, P., CHALUPA, P. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 141 s. ISBN 80-210-3791-1.
- 4) BARTUŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011, 164 s. ISBN 978-80-247-3533-7.
- 5) BAS, S., MUZZIN, P., VISCHER, T.L. *Chlamydia trachomatis* serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, roč. 39, č. 11, s. 4082-4085.
- 6) BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha : Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-2380-297-6.
- 7) BIOLOGIE V KOSTCE [online], [cit. 2013-04-20]. Dostupné z : <http://biologie-v-kostce.blogspot.com/2011/05/242-terminologie.html>
- 8) ČINÁTL, J., NOVÁK, M. *Tkáňové a buněčné kultury: příprava a pěstování*, Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1968, s. 253.
- 9) DVOŘÁKOVÁ, K. Nejčastější sexuálně přenosné infekce a možnosti jejich léčby. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2009, roč. 23, č.1, s.24-29, ISSN 1212-7973
- 10) FÖRST, M., ŠTĚPÁNOVÁ, V., BUCHTA, V. Chlamydiové infekce urogenitálního systému – využití přímé imunofluorescence v diagnostice *Chlamydia trachomatis* ve východočeském regionu České republiky v letech 1997–2003. *Česká gynekologie*, 2005, roč. 70, č. 2, s.128-133. ISSN 1210-7832.

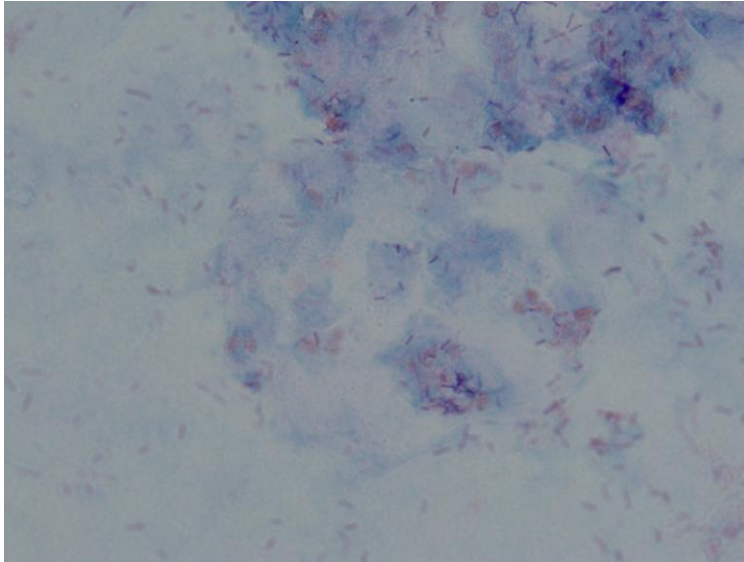
- 11) FÖRST, M., ŠTĚPÁNOVÁ, V., MLYNÁŘ, J. Přímá diagnostika infekcí *Chlamydia trachomatis* – průkaz antigenu imunofluorescenční metodou. *Interní medicína pro praxi*, 2004, č. 8, s. 412-415. ISSN 1212-7299.
- 12) GALSKÝ, J. Chlamydie – diagnostika a terapie. *Postgraduální medicína*, 2011, roč. 13, č. 4, s. 368-377. ISSN 1212-4184.
- 13) GENEPROOF. *Chlamydia trachomatis, PCR Kit*. Brno: GeneProof a.s., 2010, [cit. 2013-04-12] Dostupné z:
http://www.geneproof.com/_dokumenty/data/inserts/qCHT%20Pribalova%20Informace-04.pdf
- 14) GÖPFERTO VÁ, D., JANOVSKÁ D., DOHNAL, K. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena: pro střední a vyšší odborné školy*, Praha: Triton, 2002, 148s. ISBN 80-7254-223-0.
- 15) GREENWOOD, D., SLACK, R.C.B., PEUTHERER, J.F. *Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogenéze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s, 1999, 686s. ISBN 80-7169-365-0.
- 16) HEŘMAN, H. Chlamydiové infekce v gynekologii a porodnictví. *Moderní babictví*, 2005, č.6, s.19-23. ISSN 1214-5572.
- 17) HOROVÁ, B. Chlamydiové infekce: příznaky, diagnostika, interpretace výsledků a léčba. *Medicína pro praxi*, 2011, roč. 8, č. 12, s. 528-531. ISSN 1214-8687.
- 18) HRUBÁ, D. Chlamydiové infekce. *Postgraduální medicína*, 2004, č. 4, s. 395-399. ISSN 1212-4184.
- 19) KESHISHIAN, H. Ross Harrison's "The Outgrowth of the Nerve Fiber as a Mode of Protoplasmic Movement". *Journal of Experimental Zoology*. 2004, 301: 201-203.
- 20) KLUYTMANS, J.A., et al. Evaluation of Clearview and Magic Lite tests, polymerase chain reaction, and cell culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(12): 3204–3210.

- 21) KOBLIHA, P., GERŽOVÁ, H., DANČÍKOVÁ, Z. Problematika chlamydií v gynekologii dětí a mladistvých. *Vox pediatrics*, 2005, roč. 5, č.2, s. 29-30, ISSN 1213 – 2241
- 22) KOLOMBO, I., PORŠ, J., PORŠOVÁ, M. Intracelulární patogeny v urologii. *Urologie pro praxi*, 2007, roč. 8, č. 5, s. 205-210. ISSN 1213-1768.
- 23) KRAMÁŘ, R. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích: Zdravotně sociální fakulta, České Budějovice, 2007, 72s. ISBN 978-80-7394-021-8.
- 24) KULTIVACE BUNĚK IN VITRO [online], [cit.2013-04-20]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky_MM09.pdf
- 25) MAŠATA, J., JEDLIČKOVÁ, A. *Infekce v gynekologii*. 1.vyd. Praha: Maxdorf, 2006, 154s. ISBN 80-7345-107-7.
- 26) MATOUŠKOVÁ, M., HANUŠ, M. *Chlamydia trachomatis – postrach urologické ambulance?*. *Urologie pro praxi*. 2009, roč. 10, č. 2, s. 60-64. ISSN 1213-1768.
- 27) MEDKOVÁ, Z., KALOUSEK, I., JARČUŠKA, P. *Chlamydiové infekce*. 1. vyd. Praha: Triton, 2001, 111 s. ISBN 80-7254-222-2.
- 28) NEILL, S., LEWIS, F. *Ridley's The Vulva*. New York: John Wiley & Sons, 2009, 272s. ISBN 14-4431-669-9.
- 29) PAVLÍK, E. Nepřehlížejme chlamydie. *Statim*, 1992, roč. 1, č. 18, s. 4-5. ISSN 1210-437X.
- 30) PORŠOVÁ, M., PORŠ, J., KOLOMBO, I. Urogenitální chlamydiové infekce. *Postgraduální medicína*, 2011, č.1, s. 77-82, ISSN 1212-4184.
- 31) QUINT, K.D., BOM, R.J.M., BRUISTEN, S.M. Comparison of three genotyping methods to identify *Chlamydia trachomatis* genotypes in positive men and women. *Molecular and Cellular Probes*, 2010, roč. 24, č. 5, s. 266 – 270.
- 32) ROURS, I.G.I.J.G., HAMMERSCHLAG, M.R., OTT, A. *Chlamydia trachomatis* as a cause of neonatal conjunctivitis in Dutch infants. *Pediatrics*, 2008, roč. 121, č. 2, s. 321– 326.

- 33) SCHINDLER, J. *Mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2010, 223s. ISBN 978-80-247-3170-4.
- 34) TORŠOVÁ, V. Urogenitální chlamydiové infekce: stále akutní problém. *Praktická gynekologie*. 2004, č. 4, s. 53-57. ISSN 1211-6645.
- 35) VELEMÍNSKÝ, M., ŠVIHOVEC, P. *Infekce plodu a novorozence*. 1. vyd. Praha: Triton, 2005, 414s. ISBN 80-7254-614-7.
- 36) VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003, 495s. ISBN 80-902896-6-5.
- 37) ŽAMPACHOVÁ E., Diagnostika infekcí způsobených *Chlamydia trachomatis*. *Remedia Klin. Mikrobiologie*, 1998, roč.2, č.3, s.75-78. ISSN 1211-7684.
- 38) ŽDICHYNEC, B. *Chlamydie: skrytá hrozba v těle*. 1. vyd. Praha: Český klub, 2009, 111s. ISBN 978-80-86922-14-0.

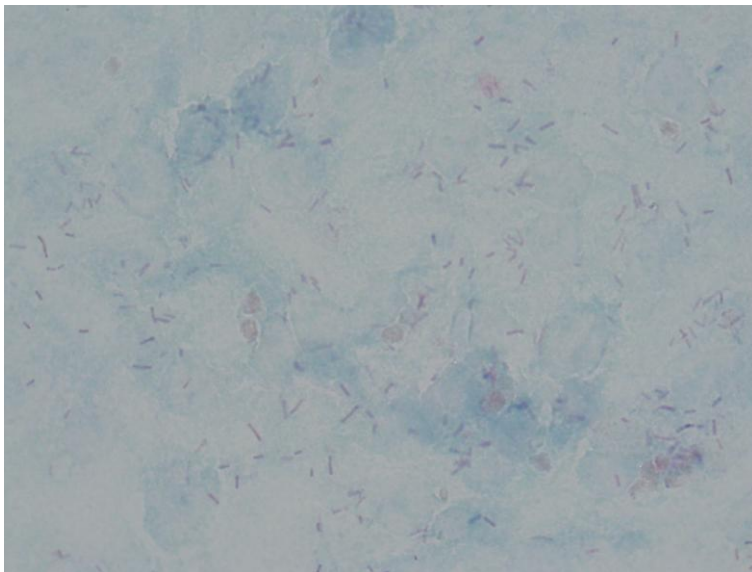
9. Přílohy

Obr. 2



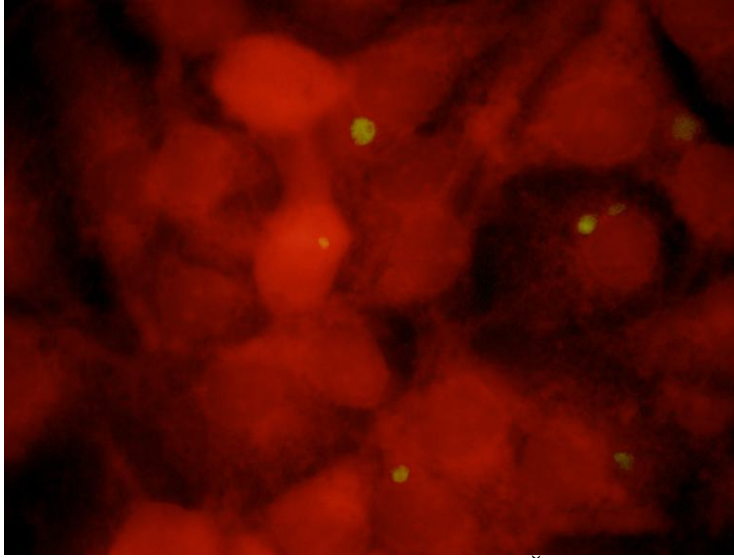
(Zdroj: Foceno za pomoci MUDr. Pavla Žampacha)

Obr. 3



(Zdroj: Foceno za pomoci MUDr. Pavla Žampacha)

Obr.4



(Zdroj: Foceno za pomoci MUDr. Pavla Žampacha)