



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

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

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

Bakalářská práce

# Současné možnosti laboratorní diagnostiky pneumokokových infekcí

Vypracoval: Irena Čapková  
Vedoucí práce: MUDr. Magda Balejová

České Budějovice 2014

## Abstrakt

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) může být běžnou kolonizující flórou lidského nosohltanu, ale také může být jedním z hlavních patogenů, vyvolávajících invazivní pneumokokové onemocnění. Jeho diagnostika je založena na přímém průkazu pomocí metod mikroskopie, kultivace, identifikace a bezkultivačního průkazu antigenu či deoxyribonukleové kyseliny (DNA).

Úvodní část práce je věnována popisu rodu *Streptococcus*, včetně druhu *S. pneumoniae*. Je popsána morfologie, fyziologie, antigenní struktura, patogeneze i patogenita tohoto bakteriálního rodu a druhu i teoretický popis jednotlivých metod laboratorní diagnostiky.

V metodice jsou popsány postupy identifikačních metod, tak jak byly použity k diagnostice *S. pneumoniae* v Laboratoři lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie Nemocnice České Budějovice a.s. Popsány jsou kultivace biologických vzorků, z kterých byl *S. pneumoniae* izolován, ale také jednotlivé identifikační testy, které umožňují rozlišit *S. pneumoniae* od ostatních viridujících streptokoků.

K diagnostice byly využity dva základní, běžně užívané identifikační testy – test citlivosti k optochinu a test rozpustnosti ve žluči – deoxycholát sodný. Test rozpustnosti účinkem deoxycholátu sodného je základním testem v diagnostice *S. pneumoniae*. Ze 127 testovaných kmenů, získaných kultivačním průkazem s pozitivním testem rozpustnosti ve žluči, bylo v testu citlivosti k optochinu pozitivních 114 testovaných kmenů. Test citlivosti k optochinu měl úspěšnost 89,9%. Metodou hmotnostní spektrometrie Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF MS) byly testovány pouze 4 kmeny primárně určené jako viridující streptokoky. Tuto specifickou, rychlou a přesnou metodu nelze k identifikaci *S. pneumoniae* zcela využít, díky velmi blízkému genotypu se *Streptococcus oralis/mitis*.

K průkazu antigenu *S. pneumoniae* byly použity a popsány dva testy – imonochromatografický test a latex aglutinační reakce. Imunochromatografickým testem byl prokázán 15 x antigen z moči a likvoru z celkem vyšetřovaných 266 vzorků a latex aglutinační reakcí se podařilo prokázat 7x antigen *S. pneumoniae* v hemokultuře a

likvoru. Tyto dvě metody jsou vysoce specifické. Podávají rychlou informaci o přítomnosti antigenu *S. pneumoniae* ve vyšetřovaném vzorku a tedy o možnosti probíhající závažné pneumokokové infekce. Dalším vysoce specifickým testem k diagnostice závažných invazivních pneumokokových onemocnění je průkaz DNA metodou PCR, který byl úspěšný u 5 vzorků likvoru, vyšetřovaných současně i v Laboratoři molekulární biologie a genetiky, Nemocnice České Budějovice a.s.

**Klíčová slova:** *Streptococcus pneumoniae*, viridující streptokoky, citlivost k optochinu, rozpustnost ve žluči - deoxycholát sodný, MALDI TOF MS, průkaz antigenu, průkaz DNA

## Abstract

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) can be common colonizing flora of human nasopharynx, but it also can be one of the main pathogens causing invasive pneumococcal disease. It is diagnosed directly, using various methods, such as microscopy, cultivation, identification, or non-cultivation proof of antigen or deoxyribonucleic acid (DNA).

First part of my thesis is dedicated to the description of the *Streptococcus* genus, including species *S. pneumoniae*. Morphology, physiology, antigenic structure, pathogenesis and pathogenicity of this bacterial race and species is described, as well as theoretical description of laboratory diagnostics methods.

In methodics, the identification methods are described as they were used for diagnostics of *S. pneumoniae* in the Laboratory of medicinal microbiology, Department of bacteriology Nemocnice České Budějovice a.s. It also includes description of cultivation of biological samples, which was *S. pneumoniae* isolated from, and several identification tests which can differentiate *S. pneumoniae* from other viridans streptococci.

Two basic, commonly used identification tests were used for diagnostics – test of sensitivity to optochin and test of solubility in bile – sodium deoxycholate. Test of solubility using sodium deoxycholate is a basic test in diagnostics of *S. pneumoniae*. Out of 127 species which were positive in the solubility test, 114 were also positively tested for sensitivity to optochin. Test of sensitivity to optochin had 89,9% accuracy. Four species primarily identified as viridans streptococci were tested using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF MS). This specific, fast and accurate method cannot be fully used for identification of *S. pneumoniae* however, because its genotype is far too similar to the one of *Streptococcus oralis/mitis*.

Two tests were used and described to prove the antigen *S. pneumoniae* – imunochromatographic test and latex agglutination reaction. Out of 266 examined samples, antigen was found in fifteen cases in urine and cerebrospinal fluid using the imunochromatographic test, and in seven cases, the antigen was proved using the latex

agglutination reaction. These two methods are highly specific and provide fast information about the presence of the antigen *S. pneumoniae* in the examined sample and subsequently about the possibility of pneumococcus infection. Another highly specific test used for diagnostics of severe pneumococcus diseases is DNA proof using PCR methods, which was successful in 5 cerebrospinal fluid samples, which were examined simultaneously in the Laboratory of molecular biology and genetics of Nemocnice České Budějovice a.s.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, viridans streptococci, sensitivity to optochin, solubility in bile – sodium deoxycholate, MALDI TOF MS, proof of the antigen, DNA proof

## **Prohlášení**

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

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

V Českých Budějovicích dne 2.5.2014

Irena Čapková

## **Poděkování**

Velmi děkuji MUDr. Magdě Balejové za odbornou pomoc a vedení mé bakalářské práce. Také děkuji spolupracovníkům z Pracoviště bakteriologie Laboratoře lékařské mikrobiologie Nemocnice České Budějovice a.s. za spolupráci. A nesmím zapomenout velmi poděkovat své rodině za trpělivost a velkou podporu při mém studiu.

# Obsah

1 Rod <i>Streptococcus</i> .....	12
1.1 Popis .....	12
1.2 Rozdělení .....	12
1.2.1 Streptokoky ústní - alfa - hemolytické, gama - hemolytické .....	13
1.2.1.1 Patogenita .....	13
1.2.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	13
1.2.2.1 Morfologie .....	14
1.2.2.2 Kultivace a fyziologie .....	14
1.2.2.3 Antigenní struktura .....	15
1.2.2.4 Patogeneze .....	15
1.2.2.5 Patogenita .....	18
1.3 Preanalytická fáze vyšetření vzorků .....	19
1.4 Laboratorní diagnostika .....	20
1.4.1 Mikroskopie .....	20
1.4.2 Kultivační průkaz .....	21
1.4.3 Identifikace .....	21
1.4.3.1 Test citlivost k optochinu .....	22
1.4.3.2 Test rozpustnosti ve žluči – deoxycholát sodný .....	22
1.4.3.3 Latexový test k průkazu <i>S. pneumoniae</i> z bakteriální kultury .....	22
1.4.3.4 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS .....	22
1.4.3.5 Automatizovaná identifikace mikroorganismů na přístroji VITEK 2 .....	23
1.4.4 Průkaz antigenu <i>S. pneumoniae</i> .....	24
1.4.4.1 Latexový aglutinační test .....	24
1.4.4.2 Imunochromatografický test .....	24
1.4.5 Průkaz DNA <i>Streptococcus pneumoniae</i> metodou PCR .....	24
1.5 Interpretace výsledku .....	25
2 Cíl práce .....	26
3 Metodika .....	27
3.1 Průkaz antigenu <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	27
3.1.1 Latex aglutinační test .....	27
3.1.2 Imunochromatografická metoda .....	29
3.2 Mikroskopie .....	31
3.3 Kultivace .....	33
3.3.1 Kultivace výtěrů z krku, nosu .....	35
3.3.2 Kultivace výtěrů z oka a ucha .....	35
3.3.3 Vyšetření vzorků z dolních dýchacích cest .....	36
3.3.4 Laboratorní zpracování likvoru .....	38



3.3.5 Kultivace hemokultur .....	39
3.4 Identifikace <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	39
3.4.1 Optochin test.....	40
3.4.2 Deoxycholát sodný - test rozpustnosti ve žluči .....	41
3.4.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS .....	42
3.5 PCR pro průkaz DNA <i>S. pneumoniae</i> .....	44
4 Výsledky .....	45
4.1 Průkaz antigenů <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	45
4.1.1 Počet diagnostikovaných antigenů <i>S. pneumoniae</i> imunochromatografickou metodou .....	47
4.1.2 Počet diagnostikovaných antigenů <i>S. pneumoniae</i> latex aglutinační reakcí ..	47
4.2 Mikroskopické nálezy vzorků s pozitivní kultivací <i>Streptococcus pneumoniae</i> ..	48
4.3 Počty izolovaných kmenů <i>Streptococcus pneumoniae</i> z jednotlivých typů vzorků .....	49
4.4 Identifikace izolovaných kmenů <i>S. pneumoniae</i> .....	50
4.4.1 Test citlivosti k optochinu .....	50
4.4.2 Metoda rozpustnosti ve žluči – deoxycholát sodný.....	51
4.4.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS .....	52
4.5 Průkaz DNA <i>S. pneumoniae</i> metodou PCR.....	52
5 Diskuse .....	54
6 Závěr.....	57
7 Seznam použité literatury.....	58

## Seznam použitých zkratk

<b>CO<sub>2</sub></b>	Oxid uhličitý
<b>CSB</b>	Krevní agar
<b>DCD</b>	Dolní cesty dýchací
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>H<sub>2</sub></b>	Vodík
<b>MALDI TOF MS</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
<b>NaCl</b>	Chlorid sodný
<b>N<sub>2</sub></b>	Dusík
<b>PBAK</b>	Pracoviště bakteriologie
<b>PCR</b>	Polymerázová řetězová reakce
<b><i>S. pneumoniae</i></b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

## Úvod

Pneumokokové infekce, způsobené bakterií *Streptococcus pneumoniae* mohou probíhat různorodě, od onemocnění zcela běžných, neinvazivních (zánět středního ucha, záněty horních cest dýchacích) až po velmi závažná, nebezpečná, invazivní onemocnění (pneumonie, meningitidy, bakteriemie), zvláště u osob s poruchami imunity. Závažná invazivní onemocnění mohou zanechat trvalé následky, v některých případech mohou být i smrtelná. Pneumokoková onemocnění postihují osoby každého věku, vyšší nemocnost a smrtnost bývá u dětí ve věku pod 2 roky a u jedinců pokročilého věku. U určitého procenta populace je zjištěno nosičství pneumokoka u izolátů z nosu a hltanu. K laboratorní diagnostice pneumokokových infekcí jsou užívány klasické běžně užívané metody k průkazu pneumokoků, ale také modernější metody bakteriální diagnostiky.

Důležitá je nejen rychlá a správná diagnostika streptokoků, ale také interpretace výsledku. Lékař interpretující výsledek vyšetření musí zhodnotit výsledek vzhledem k místu odběru, diagnóze, celkovému klinickému stavu pacienta. Je třeba posoudit, zda izolované agens je patogen, či zda se jedná o normální mikrobiální flóru nebo nosičství patogenních bakterií.

V této práci budou zhodnoceny současné možnosti diagnostiky *S. pneumoniae* v různých biologických vzorcích a posouzeny běžně užívané laboratorní metody identifikace pneumokoků.

## **1 Rod *Streptococcus***

### **1.1 Popis**

Streptokoky jsou morfologicky grampozitivní kataláza negativní koky, které se řadí do dvojic až řetízků (řecky streptos, řetěz, kokkos, zrnko). Streptokoky netvoří spóry, jsou nepohyblivé, fakultativně anaerobní, rostou na obohacených kultivačních půdách, jako je krevní agar. I na těchto půdách bývají jejich kolonie poměrně drobné (Votava et al. 2000, Beneš 2002, Greenwood et al. 1999). Až na výjimky streptokoky nerostou při 10°C ani při 45°C ani v přítomnosti 6,5% chloridu sodného (NaCl) nebo 40% žlučových solí, ani při pH vyšším než 9, nehydrolyzují eskulin. Rod zahrnuje jak obligátní patogeny, tak příslušníky normální mikroflóry sliznic (Votava 2003).

### **1.2 Rozdělení**

V rutinní diagnostice se používá rozdělení streptokoků podle hemolýzy na krevním agaru na beta, alfa a gama – hemolytické.

Beta-hemolýza se projevuje odbarvením erytrocytů v okolí kolonií účinkem hemolyzinů, při alfa-hemolýze neboli viridaci (latinsky viridus, zelený) se krevní barvivo mění na zelený verdoglobin. Alfa-hemolýzu streptokoky vyvolávají tvorbou peroxidu vodíku, přičemž záleží na složení média a atmosféry, jestli se alfa-hemolýza projeví či nikoli (Votava 2003). Mezi streptokoky s viridací na krevním agaru patří zejména důležitý patogen *S. pneumoniae* neboli pneumokok a dále tzv. ústní viridující streptokoky. Streptokoky, v jejichž okolí se hemolýza neprojeví, se označují jako gama-hemolytické.

Kromě typu hemolýzy se streptokoky dají dělit i podle toho, zda obsahují skupinově specifický polysacharid C. Ten, chybí pneumokokům a většině ústních viridujících streptokoků. Je-li polysacharid C přítomen, je možno podle jeho antigenního složení rozeznávat serologické skupiny A-Z (Votava et al. 2010).

### **1.2.1 Streptokoky ústní - alfa - hemolytické, gama - hemolytické**

Mezi ústní streptokoky, které tvoří součást normální ústní mikroflóry zdravých lidí, se řadí většinou alfa-hemolytické druhy a gama hemolytické druhy, které se dělí do několika skupin. Mikroskopicky jsou to grampozitivní koky seřazené do kratších řetízků, vyhlížející v mikroskopu zcela stejně jako beta-hemolytické streptokoky (Votava et al. 2000).

#### **1.2.1.1 Patogenita**

Orální streptokoky, které jsou součástí dutiny ústní a nosohltanu, brání uplatnění patogenních druhů, jako jsou *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus pneumoniae*. Jsou typickými oportunními patogeny, které vyvolávají onemocnění jen u disponovaných jedinců (Votava et al. 2010).

Viridující streptokoky bývají izolovány z krve téměř u poloviny případů bakteriálních endokarditid. Jde především o streptokoky skupiny *mitis*, do které se řadí *Streptococcus mitis* a *Streptococcus oralis*, ale také *Streptococcus sanguinis* a *Streptococcus gordonii*.

Streptokoky skupiny *mutans*, kam patří hlavně *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sobrinus*, se nalézají na povrchu zubů. Při štěpení sacharidů tvoří organické kyseliny, které poškozují zubní sklovinu a způsobují vznik zubního kazu (Coykendall 1989).

Do skupiny *salivarius* řadíme především *Streptococcus salivarius*, který se nalézá hlavně ve slinách a na povrchu jazyka. Vzácně může vyvolat endokarditidu (Votava et al. 2010).

### **1.2.2 Streptococcus pneumoniae**

*Streptococcus pneumoniae* nazývaný také pneumokok byl poprvé nalezen ve sputu v roce 1881. Popsali ho Louis Pasteur ve Francii a G. M. Sternberg v USA (Greenwood

et al. 1999). Pneumokok je opouzdřený grampozitivní diplokok, citlivý k zevním vlivům. Běžně kolonizuje lidský nosohltan a je jedním z hlavních patogenů vyvolávajících invazivní pneumokoková onemocnění s celosvětovým rozšířením. Je nejčastějším etiologickým agens akutní otitis media, komunitní pneumonie stejně jako meningitidy. Součástí těchto onemocnění může být i sepse (Ramos-Sevillano et al. 2011). Onemocnění většinou vyvolává kmen, který již několik týdnů kolonizoval sliznici nemocného. Z 90 typů *S. pneumoniae* se jen něco přes dvacet typů podílí na etiologii většiny závažných pneumokokových infekcí (Votava et al. 2010).

### **1.2.2.1 Morfologie**

*S. pneumoniae* je grampozitivní kok ovoidního nebo lancetovitého tvaru, o průměru zhruba 1  $\mu\text{m}$  (Greenwood et al. 1999). Pneumokok se v preparátu barveném podle Grama vyskytuje ve dvojicích nebo řetízcích. Odvrácené konce koků ve dvojici jsou zašpičatělé, tento tvar se označuje jako lancetovitý nebo tvar plaménku. Při pozorném prohlížení odhalíme většinou kolem dvojice koků neobarvené pouzdro (Votava 2003).

### **1.2.2.2 Kultivace a fyziologie**

Kultivace je zlatým standardem přímého mikrobiálního průkazu, umožňuje získat bakteriální kulturu k dalšímu určení mikroba a k případnému zhotovení citlivosti k antimikrobiálním látkám (Hotomi, M. et al. 2012). Pro vysoké nutriční nároky se pneumokoky pěstují v obohacených půdách, zejména s přidavkem celé nebo defibrinované krve. Růst podporuje 0,1% glukóza a atmosféra s 5-10% oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$ ) (Greenwood et al. 1999). Na takto obohacených a dostatečně vlhkých půdách pneumokok vyrůstá v koloniích asi 1mm velkých, lesklých a zpočátku vypouklých – růstová S – fáze. Sérotyp 3 vyrůstá dokonce v hlenovitých, bezbarvých koloniích nepravidelného tvaru, připomínající kapky oleje. Protože nejstarší buňky uprostřed kolonie se postupně rozpadají, kolonie se podobají mističkám. Netvoří-li kmen pouzdro vůbec, roste v drsné R – fázi a je k nerozeznání od ostatních viridujících streptokoků. Všechny typy kolonií *S. pneumoniae*, vyrostlé za přístupu kyslíku na krevním agaru,

mají kolem kolonií zónu alfa-hemolýzy. V thioglykolátovém bujónu rostou pneumokoky ve formě sedimentu, půda nad ním zůstává čirá (Votava 2003, Votava et al. 2010). Stejně jako ostatní streptokoky vytvářejí po delší inkubaci kyselinu mléčnou, která poklesem pH inhibuje další růst. Pneumokoky obtížně přežívají mimo rozmezí pH 7 – 7,8 (Greenwood et al. 1999).

### **1.2.2.3 Antigenní struktura**

Na základě strukturální variability polysacharidových pouzdrných antigenů se *S. pneumoniae* klasifikuje do více než 90 serotypů a 46 seroskupin (Vacková et al. 2013). Pod polysacharidovým pouzdrmem se skrývá řada dalších antigenů. Až k buněčné membráně sahá F-antigen (Forssmanův antigen), obsahující kyselinu lipoteichoovou a cholin. Významnými faktory virulence jsou povrchové proteinové antigeny.

### **1.2.2.4 Patogeneze**

Hlavním faktorem virulence pneumokoků je jejich polysacharidové pouzdro, které je chrání před fagocytózou. Opouzdřené kmeny jsou vysoce virulentní. Naproti tomu drsné kmeny v R - fázi bez polysacharidové substance jsou zcela avirulentní a snadno fagocytovatelné (Votava 2003). Fagocytóza opouzdřených kmenů však není možná bez účinné opsonizace. Účinnou fagocytózu umožní pouze včas vytvořené protilátky proti antigenům pouzdra (Votava et al. 2010).

Většina faktorů virulence pneumokoka jsou faktory invazivity. K jejím složkám řadíme schopnost mikroba vstoupit do hostitele, což znamená jednak schopnost přilnout neboli adherovat na jeho povrchy, množit se na nich a pronikat jimi do vnitřního prostředí, dále schopnost mikroba množit se ve vnitřním prostředí hostitele, šířit se uvnitř organismu a schopnost překonávat jeho obranné mechanismy (Votava 2001). Nezbytnou složkou virulence pneumokoků s adhezními vlastnostmi je lipoprotein zvaný povrchový adhezin A. Další složkou odpovídající za adhezi a nosičství je povrchový protein C a vlastnosti adhezinu a invazinu v sobě spojuje cholin vázající

protein A. Pro průnik do plic, do krevního oběhu, na meningy a do tkání jsou pneumokoky vybaveny několika důležitými invaziny (Votava et al. 2003).

Invaziny jsou povrchové bakteriální proteiny, které po adhezenci na povrch epitelie vyvolávají změny v buněčném cytoskeletu (Votava 2001).

Jedním z invazinů je enzym hyaluronidasa, důležitá zejména v patogenezi pneumokokové meningitidy. Další enzym neuraminidasa odštěpuje zbytek kyseliny sialové z různých molekul a tím jednak poškozuje tkáň, jednak zároveň odhaluje další receptory pro pneumokokové adheziny. Pneumokokový povrchový protein A (odlišný od adhezinu A) brzdí odstraňování pneumokoků z krevního oběhu. Dále účinkuje jako specifický receptor pro laktoferin a umožňuje tak pneumokokům získávat železo, interferuje rovněž s aktivací komplementu (Votava et al. 2003). V krevní plasmě totiž vadí množení bakterií jednak přítomnost antibakteriálních látek a jednak, a to především, nedostatek volného železa. Železo jako málo rozpustný kov je přenášeno proteiny – laktoferin, transferin, které ho pevně vážou. Bakterie vyžadují železo k tvorbě cytochromů a jiných enzymů (Votava 2001).

Pneumolyzin je cytolyzin, který se uvolňuje z rozpadajících se buněk pneumokoka, už v nízkých dávkách zpomaluje oxidační pochody a chemotaxi polymorfonukleárů a naopak stimuluje tvorbu cytokinů lidskými mononukleáry. Pneumolyzin podporuje tvorbu zánětu (Votava et al. 2003). Zánět lze sice považovat za vystupňovaný způsob nespecifické obrany proti infekci, ale jeho klasické známky nejen odrážejí jeho obranný význam, ale jsou i typickými chorobnými příznaky. Jejich následkem může být za jistých situací i smrtelné poškození (Votava 2001). Ve vyšších dávkách pneumolyzin poškozuje bronchiální a alveolární epitelie a endotel plicních kapilár. Zde aktivuje fosfolipasu A, která začne štěpit fosfolipidy buněčných membrán. Tím, že pneumolyzin zatím neznámým způsobem spouští klasickou aktivaci komplementu, vypořebuje všechny jeho složky přítomné v alveolech a usnadní invazi pneumokoků (Votava et al. 2003).



Vznik zánětu podporují další složky pneumokoka, a to autolyzin, což je amidasa štěpící buněčnou stěnu. Odpovídá za buněčnou autolýzu na konci logaritmické fáze růstu a za lýzu stěny vyvolanou deoxycholátem nebo beta-laktamovými antibiotiky. Rozpadem pneumokoků se do jejich okolí uvolní jednak pneumolyzin, jednak součásti buněčné stěny, které působí intenzivně prozánětlivě. K uvolňovaným součástem buněčné stěny patří zejména polysacharid C, jež svou fosforylcholinovou složkou aktivuje alternativní dráhou komplement a hraje tak rozhodující úlohu v rozvinutí zánětu v plicích, na meningách i ve středním uchu. Polysacharid C ale také rozhodujícím způsobem přispívá k perzistenci pneumokoka na sliznici dýchacích cest (Votava et al. 2003).

Tabulka 1: Faktory virulence *Streptococcus pneumoniae* (Votava et al. 2003)

<b>Faktory virulence <i>Streptococcus pneumoniae</i></b>		
<i>faktor</i>		<i>účinek</i>
<b>polysacharidové pouzdro</b>		ochrana před fagocytózou
<b>adheziny :</b>		
	povrchový adhezin A	adherenční
	povrchový protein C	adherenční, udržení nosičství
	cholin vázající protein A	adherenční, invazivní
<b>Invaziny:</b>		
	hyaluronidasa	invazivní
	neuraminidasa	poškození tkání
	povrchový protein A	antifagocytární, získávání železa
<b>pneumolyzin</b>		antifagocytární, prozánětlivý, poškozující tkáň
<b>autolyzin</b>		prozánětlivý
<b>polysacharid C</b>		prozánětlivý

### **1.2.2.5 Patogenita**

*S. pneumoniae* je významným patogenem, většinou se však vyskytuje jako komenzál v horních cestách dýchacích člověka. Lze jej izolovat asi u 5-10% zdravých dospělých osob a u 20-40% dětí. Kolonizující serotypy se postupně obměňují. Nosičství totiž zpravidla vede k vytvoření specifické imunity proti danému kmeni a jeho eliminaci. Tím se otevře prostor pro kolonizaci jiným serotypem. Výskyt pneumokoků na sliznicích i výskyt pneumokokových onemocnění je sezónní s maximem uprostřed zimních měsíců, u dětí je toto období spíše závislé na školním roce.

Inkubační doba onemocnění je jeden až tři dny, přenáší se z člověka na člověka kapénkovou infekcí, která se šíří snadněji v uzavřených kolektivech. (Beneš 2002). Jedná se o vmetení kapénky obsahující infekční agens, při kýchnutí, mluvení, kašláni na nosní nebo ústní sliznici vnímavé osoby. Kapénkový přenos předpokládá přítomnost a těsnou blízkost zdroje i vnímavé osoby, agens totiž v prostředí nepřežívá. Kapénky mají dolet přibližně jeden až dva metry (Göpfertová et al. 1999).

Průběh infekce závisí na obranyschopnosti organismu a na virulenci serotypu způsobujícího onemocnění. Rizikové faktory usnadňující rozvinutí pneumokokové infekce jsou chronická obstrukční plicní nemoc, cukrovka, selhávání ledvin, kardiální insuficience a jiné interní nemoci, odstranění sleziny, dále pak kouření, alkoholismus, různé poruchy imunity, akutní stres, vyčerpání a také prochladnutí (Beneš 2002).

*S. pneumoniae* způsobuje pestrou škálu různých infekcí, od život zpravidla neohrožujících akutních otitid či sinusitid až po nejzávažnější invazivní onemocnění, jakými jsou meningitidy, bakteriémie, sepse či pneumonie (Vacková et al. 2013).

Pneumokoková pneumonie mívá obvykle náhlý začátek, který je provázen zimnicí, třesavkou a objevuje se i vysoká horečka. Pacient je dušný, schvácený, stěžuje si na bolest na hrudníku, pokašlává. Kašel je zpočátku suchý po několika dnech produktivní s tvorbou rezavého sputa. Běžným nálezem je tachykardie a tachypnoe, starší nemocní mohou být i afebrilní. Pneumokok ale také může způsobit zcela necharakteristický zápal plic, zejména když nasedá na předcházející virové onemocnění (Beneš 2002).

Mortalita u pneumokokové pneumonie je kolem 15%, tato četnost se zvyšuje s věkem, při bakteriémii, při metastatické infekci a při infekci některými serotypy. Při

pneumokokové pneumonii se může rozvinout zhruba v 15% komplikace, bakteriémie. Je způsobena šířením pneumokoků plicními lymfatickými cestami do krevního oběhu, které může vyústit v metastatické postižení meningů, kloubů a někdy, byť zřídka, i endokardu. Pneumokoky mohou do krevního oběhu proniknout i z faryngu (Greenwood et al. 1999).

*S. pneumoniae* je v České republice nejčastější příčinou bakteriální meningitidy u dospělých i u dětí starších šest měsíců. Onemocnění začíná z plného zdraví horečkou, cefaleou, nauzeou, zvracením, rychle nastupuje porucha vědomí. U většiny pacientů se vyskytuje v anamnéze čerstvě prodělané respirační onemocnění. K purulentní meningitidě může také dojít šířením infekce do nitrolebí jako následek mastoitidy (Beneš 2002).

Pneumokoky mohou vzácně vyvolat náhle a rychle probíhající sepsi. Během onemocnění dochází k velmi rychlému multiorgánovému selhání a pacient během několika následujících hodin nebo dnů i přes veškerou poskytnutou péči a antibiotickou léčbu může zemřít (Beneš 2002).

Mortalita pneumokokové infekce závisí na věku, předchozím onemocnění a serotypu původce. Infekce způsobené serotypem 3 jsou nejvážnější. Mortalitu až 50% zaznamenáváme u pacientů starších 65 let s bakteriemií a přidruženým onemocněním jiného původu (Greenwood et al. 1999).

### **1.3 Preanalytická fáze vyšetření vzorků**

Správné rozhodnutí o způsobu a místě odběru a druhu vzorku ovlivňuje úspěšnou mikrobiologickou diagnostiku. Při odběru mikrobiologických vzorků jsou kladeny nároky na zručnost, z důvodu minimalizace kontaminace vzorku. Při odběrech primárně sterilních vzorků, jako je např. odběr krve na hemokulturu se musí dodržet přísné zásady aseptiky. Při odběrech všech vzorků je nutné používat vhodné sterilní odběrové pomůcky. V případě potřeby, si lze vždy upřesnit informace u spolupracující laboratoře, např. jak a do jaké soupravy má být vzorek odebrán. Také rychlý transport a správné uchování vzorků při vhodné teplotě je zcela zásadní pro úspěšnost a správnost výsledku vyšetření.

## **1.4 Laboratorní diagnostika**

Laboratorní diagnostika *S. pneumoniae* je založena především na mikroskopickém a kulturačním vyšetření správně odebraného biologického materiálu (Beneš 2002, Votava et al. 2010). Další diagnostickou metodou je bezkultivační průkaz antigenu a průkaz DNA (Rosón et al. 2004, Le Monnier et al. 2006, Nolte 2008).

### **1.4.1 Mikroskopie**

Nejběžnější bakteriologickou metodou mikroskopického vyšetření je barvení dle Grama. Toto barvení nám umožňuje rozdělit bakterie na dvě základní skupiny:

- Bakterie grampozitivní (G+)
- Bakterie gramnegativní (G-)

Rozdělení mikrobů dle barvitelnosti podle Grama odráží řadu jejich anatomických a fyziologických vlastností a také souvisí s jejich citlivostí na různá antibiotika.

Barvení dle Grama je pro třídění a taxonomii bakterií nezbytné. Podstatou rozdílu v barvitelnosti bakterií dle Grama je jejich odlišná stavba bakteriální stěny. Grampozitivní bakterie mají poměrně jednoduchou stavbu buněčné stěny, která je tvořena poměrně mohutnou vrstvou peptidoglykanu a je protkaná řetězci kyseliny teichoové. Jejich buněčná stěna by se tedy dala přirovnat k tlustému korzetu, který pevně fixuje komplex krystalové violeti s jódem vzniklý při barvení.

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je tenčí, ale o mnoho složitější. Je složena z dvojité fosfolipidové vnější membrány, pod ní se nachází v tenké vrstvě peptidoglykan. Prostor mezi vnější membránou stěny a cytoplasmatickou membránou se nazývá periplasmatický prostor, který obsahuje rozmanité enzymy (Votava et al. 2010).

Při barvení dle Grama vzniká v bakteriální buňce komplex krystalové violeti s jódem, který se u gramnegativních bakterií snadno vyplavuje alkoholem nebo acetonem

a tyto bakterie se mohou v další fázi barvení dobarvit karbolfuchsinem a jsou pak ve výsledném barvení červené. Kdežto u grampozitivních bakterií vytvořený komplex krystalové violeti s jódem odbarvování nějakou dobu vzdoruje a tyto bakterie pak zůstávají tmavomodré (Votava et al. 2000).

Zkušený mikrobiolog již po přečtení takto obarveného preparátu je schopen vyslovit podezření na infekci vyvolanou *S. pneumoniae* (Votava et al. 2010). Další možnou technikou mikroskopického průkazu je barvení tuší dle Burriho ke znázornění bakteriálních pouzder. Tato barvicí metoda se však v běžné laboratorní praxi příliš nevyužívá (Votava et al. 2000).

#### **1.4.2 Kultivační průkaz**

Kultivace je zlatým standardem přímého mikrobiálního průkazu, umožňuje získat bakteriální kulturu k dalšímu určení mikroba a k případnému zhotovení citlivosti k antimikrobiálním látkám (Hotomi et al. 2012). Základní půdou pro kultivaci pneumokoků je krevní agar, je to nejběžnější půda užívaná ke kultivaci v klinické mikrobiologii. Kolonie pneumokoka na ní rostou v malých šedavých koloniích někdy mukózních, které jsou obklopeny zelenou zónou  $\alpha$  hemolýzy. Růst pneumokoků podněcuje přidavek krve a zvýšená tenze CO<sub>2</sub>. Po 24 až 48 hodinách kultivace, se nejstarší buňky uprostřed kolonie postupně rozpadají a kolonie se podobají mističkám (Werno et al. 2008).

#### **1.4.3 Identifikace**

Podobnost mezi *S. pneumoniae* a jinými viridujícími streptokoky vyžaduje provedení další identifikace. Používáme běžně užívané testy, rozpustnost ve žluči, citlivost pneumokoka k optochinu a latexový test (Murray et al. 1999, Richter et al. 2008, Votava et al. 2003). Další možností identifikace mohou být poměrně nové metody hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS a automatizovaná identifikace mikroorganismů na přístroji VITEK 2.

#### **1.4.3.1 Test citlivost k optochinu**

Citlivost k optochinu je metoda zavedená již od počátku druhé poloviny dvacátého století. Jedná se o citlivost k diagnostickému disku optochin (ethylhydrocuprein hydrochlorid), který se využívá k jednoduché, orientační, předběžné diferenciaci *S. pneumoniae* od jiných viridujících streptokoků. Test je používán především u ojedinělého nálezu *S. pneumoniae*, kdy slouží zároveň i k izolaci kmene. Vyhodnocení tohoto testu probíhá na základě měření velikosti vytvořené inhibiční zóny kolem disku (Isenberg 2007, Murray et al. 1999).

#### **1.4.3.2 Test rozpustnosti ve žluči – deoxycholát sodný**

Jako konfirmační test k citlivosti k optochinu se využívá test rozpustnosti ve žluči - deoxycholát sodný. Princip tohoto testu je založen na rozpustnosti kolonií *S. pneumoniae* v deoxycholátu sodném. Naproti tomu kolonie viridujících streptokoků se působením deoxycholátu sodného nerozpouští (Isenberg 2007, Murray et al. 1999). Jedná se o jednoduchý, časově nenáročný, vysoce specifický test, který využívá účinnost autolytických enzymů *S. pneumoniae* aktivovaných žlučí (Bednář et al. 1996).

#### **1.4.3.3 Latexový test k průkazu *S. pneumoniae* z bakteriální kultury**

K latexovému testu se využívá reagens obsahující latexové částice sensibilizované směsí protilátek proti všem známým typům pneumokoků. Podezřelá kolonie se rozmíchá v kapce reagens a v pozitivním případě dojde k shlukování nebo-li aglutinaci (Votava et al. 2010).

#### **1.4.3.4 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS**

Jako nová technologie schopná identifikovat bakteriální izoláty se ukázala hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS. Tato technika může zkoumat profil proteinů na základě relativní molekulové hmotnosti z bakteriálních extraktů nebo dokonce z neporušené bakterie. Obecně platí, že mikrobiální identifikace MALDI-TOF

MS se skládá ze čtyř kroků: nanesení izolované kolonie, realizace hmotnostního spektra, srovnání s databází a dosahování výsledků. Identifikace se provádí z izolované kolonie, která se nanese do terčíku na testovací destičce. Tato deska umožňuje analyzovat 48 vzorků v jedné analýze. Nanesená bakterie se zakape matricí, která krystalizuje při pokojové teplotě. Tato matrice má dva základní úkoly, uvolňuje intracelulární proteiny porušením buněčné membrány a usnadňuje odpařování a ionizaci bílkovin pulzním laserovým paprskem. Ionizované proteiny putují vakuovou komorou a detekují se v závislosti na hmotnosti a času letu. K identifikaci se využívá softwaru, který porovnává identifikovaná spektra bakterie se všemi hmotnostními spektry v komerční databázi (Garcia et al. 2012, bioMérieux S.A. 2011). I takto rychlá a sofistikovaná metoda má svá úskalí nejen v přípravě a nanášení vzorku před analýzou hmotnostní spektrometrie, ale i ve výkonnosti MALDI TOF MS v identifikaci bakterií v porovnání se standardními metodami. Velmi obtížná je identifikace alfa hemolytických streptokoků *Streptococcus oralis/mitis* a *Streptococcus pneumoniae*, které mají velmi blízký genotyp. Identifikace gram-pozitivních bakterií rodu *Streptococcus* by se měla vylepšit s probíhajícím technickým rozvojem a dalším zdokonalováním referenčního spektra v databázi MALDI TOF MS (Risch et al. 2010, Ikryannikova et al. 2013, Kok et al. 2011).

#### ***1.4.3.5 Automatizovaná identifikace mikroorganismů na přístroji VITEK 2***

Další poměrně novou metodou diagnostiky *S. pneumoniae* je automatizovaná identifikace mikroorganismů na přístroji VITEK 2. Výsledky identifikace, která probíhá na identifikačních kartách, jsou dostupné přibližně za osm hodin. Určení probíhá na základě měření utilizace zdroje uhlíku, rezistence a enzymatické aktivity pomocí 43 biochemických testů (bioMérieux S.A. 2011).

#### **1.4.4 Průkaz antigenu *S. pneumoniae***

Další diagnostickou metodou pneumokokových infekcí, využívanou převážně v diagnostice meningitid, je bezkultivační průkaz antigenu. Tento průkaz se nejčastěji provádí v likvoru latexovou aglutinací.

##### **1.4.4.1 Latexový aglutinační test**

Latexový aglutinační test je založen na průkazu specifického bakteriálního antigenu na povrchu *S. pneumoniae* (Scharfen 2013). Lze jím identifikovat nejčastější původce bakteriálních meningitid *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *S. pneumoniae*, streptokoky skupiny B a *Escherichia coli* s kapsulárním antigenem K1. Tento test má poměrně vysokou citlivost a specifčnost.

##### **1.4.4.2 Imunochromatografický test**

Poměrně novou metodou pro bezkultivační průkaz antigenu *S. pneumoniae* přímo v biologickém materiálu je imunochromatografický test. Tento test detekuje C – polysacharidový antigen buněčné stěny *S. pneumoniae*, který je specifický pro všechny pneumokokové serotypy, na rozdíl od jiných méně citlivých testů, které detekují kapsulární antigen. Tento test je jednoduchý na provedení a poskytuje rychlé a užitečné výsledky během 15 minut. (Rosón et al. 2004, Le Monnier et al. 2006). Test má senzitivitu 70 – 80% a specifitu 90%. Výsledky testu mohou být ve značné míře falešně pozitivní u dětí, které jsou kolonizovány *S. pneumoniae* v nosohltanu. Falešně pozitivní reakce můžeme prokázat také několik týdnů po očkování proti *S. pneumoniae*. Tento imunochromatografický test lze využít k průkazu *S. pneumoniae* v moči v diagnostice pneumonie a v mozkomíšním moku v diagnostice meningitidy (Werno et al. 2008).

#### **1.4.5 Průkaz DNA *Streptococcus pneumoniae* metodou PCR**

Metodou přímého bezkultivačního průkazu DNA *S. pneumoniae* je PCR v reálném čase. Je to metoda pro rychlou diferenciální detekci bakteriálních příčin invazivních



onemocnění, především bakteriální meningitidy a pneumonie. Bylo prokázáno, že *S. pneumoniae* je převládajícím patogenem způsobujícím komunitní pneumonii. Cílem průkazu, který nám poskytuje metoda PCR, je rychlá diagnóza s brzkým zahájením správné antibiotické terapie na základě znalosti etiologického agens. Rychlé a přesné stanovení patogena, je vnímáno jako celosvětový problém, díky zvyšující se rezistenci bakterií k antimikrobiálním látkám. (Mustafa et al. 2011). PCR může detekovat nepatrné množství nukleové kyseliny, které není závislé na životaschopnosti bakterie a je pravděpodobně méně ovlivněno předchozí antibiotickou léčbou než kultivační průkaz patogena (Nolte 2008). Biologickým materiálem, který je možné použít pro PCR detekci *S. pneumoniae* v diagnostice pneumonie je bronchoalveolární laváž, nesrážlivá krev a v případě meningitidy likvor. Ve studii porovnávající kultivační průkaz, latex aglutinační reakci a metodu PCR pro průkaz DNA původce pneumonie byla ověřena velká specifita a citlivost metody PCR, nicméně tato metoda je drahá a rutinní použití je tedy omezeno. Průkaz DNA pneumokoků by se neměl považovat za alternativní metodu kultivačního průkazu, neboť ten nám poskytuje informace o antibiotické rezistenci a serotypu pneumokoků (Matos et al. 2001).

### **1.5 Interpretace výsledku**

V interpretaci výsledku vyšetření mikrobiolog komentuje, zda nález může být kontaminací, kolonizací nebo odpovídá běžné bakteriální flóře v místě odběru. Definitivní interpretace nálezu je v rukou ošetřujícího lékaře, který má k dispozici všechny informace o pacientovi. Proto je konzultace klinika a mikrobiologa ke správnému posouzení vyšetření velice důležitá (Votava et al. 2010).

## **2 Cíl práce**

Cílem této práce bylo zhodnotit současné možnosti laboratorní diagnostiky pneumokokových infekcí v Laboratoři lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie Nemocnice České Budějovice a.s. a posoudit běžně užívané identifikační metody k průkazu *Streptococcus pneumoniae* v různých biologických vzorcích.

### 3 Metodika

Laboratorní diagnostika *S. pneumoniae* byla prováděna v Laboratoři lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie (PBAK) Nemocnice České Budějovice a.s. Identifikace pneumokoků byla prováděna na základě průkazu antigenu *S. pneumoniae* u závažných primárně sterilních vzorků, dále na základě mikroskopie a kultivačního zpracování biologického materiálu. K vlastnímu rozlišení u získaných 127 kmenů *S. pneumoniae* od dalších viridujících streptokoků byly použity testy rozpustnost ve žluči - deoxycholát sodný (fa. ITEST plus) a test citlivost k optochinu (fa. ITEST plus).

#### 3.1 Průkaz antigenu *Streptococcus pneumoniae*

V laboratoři lékařské mikrobiologie v PBAK byly použity pro průkaz antigenu *S. pneumoniae* ve vzorcích (likvor, moč, hemokultura) dva testy – průkaz antigenu latexovou aglutinací, imunochromatografická metoda.

##### 3.1.1 Latex aglutinační test

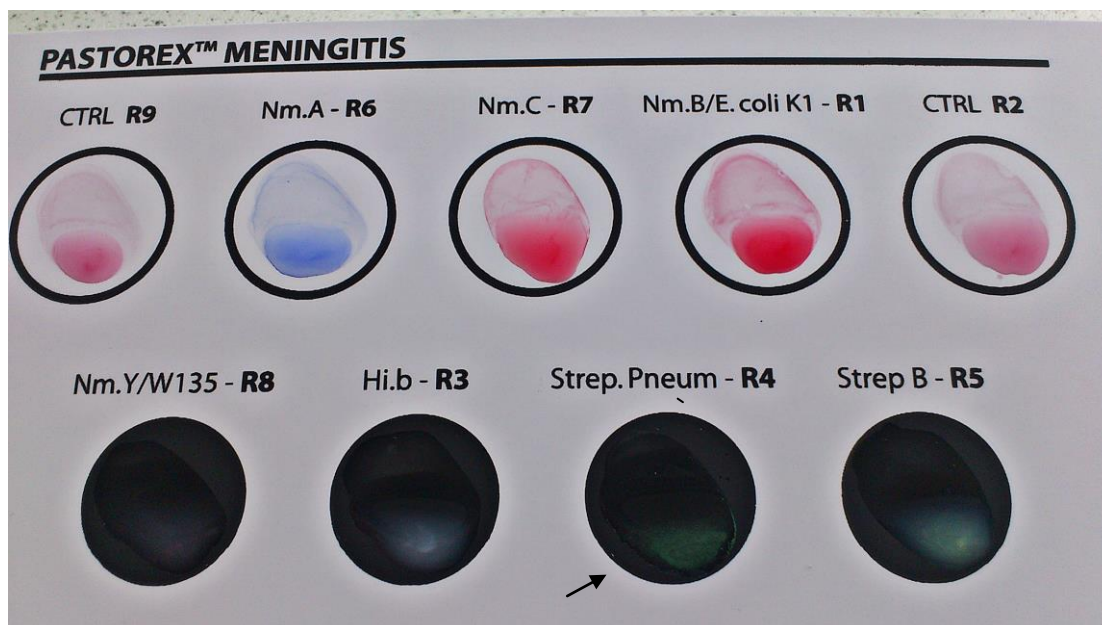
Jelikož kultivace likvoru vyžaduje nejméně 18-24 hodinovou inkubaci, rozhoduje se o rychlém nasazení antibiotické léčby, na základě mikroskopického vyšetření preparátu obarveného dle Grama, ale také na základě pozitivního průkazu antigenu ve vzorku latex aglutinačním testem (Scharfen 2013).

Na pracovišti bakteriologie byl použit latex aglutinační test PASTOREX™ Meningitis (fa. BIO-RAD). Principem testu je reakce specifické protilátky navázané na latexových částicích a homologního antigenu, který je specifický pro určitá etiologická agens bakteriálních meningitid a jejich některé skupiny či serotypy (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* typ b, *Neisseria meningitidis* skupiny A, skupiny B/E.coli K1, skupiny C, skupiny Y/W135 a *Streptococcus* skupiny B). Pokud je antigen přítomen ve vyšetřovaném materiálu, dochází k aglutinaci latexových částic s navázanou homologní protilátkou. Tímto testem lze prokazovat antigen ve vzorcích krve z hemokultivační nádoby, v mozkomíšním moku, v séru a v moči. V laboratoři

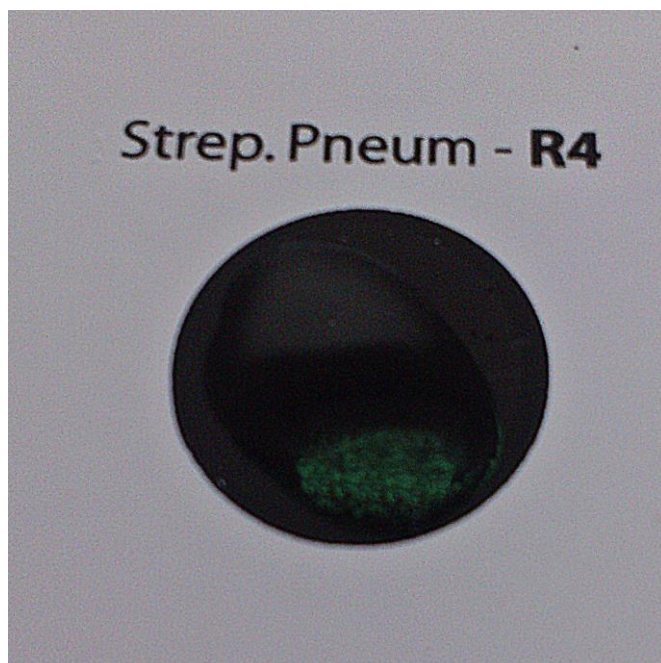
jsou tyto vzorky zpracovávány co nejrychleji po příjmu do laboratoře. V PBAK je nejčastějším biologickým materiálem pro průkaz antigenu latexovou aglutinací mozkomíšní mok. Po jeho příjmu do laboratoře a makroskopickém zhodnocení, byl mok centrifugován 5 minut při 1500 otáčkách, poté byl odsát supernatant, který byl zahříván 3 minuty při 100°C ve vodní lázni. Po zchladnutí byl supernatant znovu centrifugován 5 minut při 1500 otáčkách a následně byl použit k vlastnímu testu. Po jedné kapce supernatantu bylo sterilně přeneseno do všech vyznačených polí na testovací kartě. Do každého pole byla přidána kapka odpovídajícího latexového činidla s navázanými protilátkami. Obě kapky byly promíchány jednorázovou tyčinkou, na každé pole byla použita nová tyčinka. Po dobu 10 minut bylo jemně krouženo testovací kartou a byl sledován vznik aglutinátu. Intenzita reakce a rychlost vzniku aglutinátu závisí na koncentraci antigenu v testovaném vzorku (Příbalový leták Pastorex™ Meningitis 2008, NCB\_PBAK\_PP\_12\_149\_A).

Obrázek 1: Latex aglutinační test PASTOREX™ Meningitis fa. BIO-RAD

(Zdroj: autorka)



Obrázek 2: Aglutinace antigenu *S. pneumoniae* s navázanou homologní protilátkou na latexových částicích (Zdroj: autorka)



### 3.1.2 Imunochromatografická metoda

V PBAK bylo ve sledovaném období vyšetřeno 259 vzorků moče a 7 vzorků mozkomíšního moku, u kterých byla požadována imunochromatografická detekce antigenu *S. pneumoniae*.

Vzorek pacienta byl temperován na pokojovou teplotu, poté byl do testovaného vzorku ponořen tampon z identifikační sady Binax Now *Streptococcus pneumoniae* (fa. ALERE). Při vyjmutí tamponu ze vzorku, byl otřen o stěnu zkumavky, pro odstranění přebytečného množství materiálu. Poté byl tampon zasunut do spodního okénka testovací kazety, tak aby byl celý vidět v horní části testu. Do spodního okénka byly z výšky 1-2cm kápnuty 3 kapky reagentu A z testovací sady. Byla odstraněna adhezivní páska na pravé straně testovací kazety a ta byla uzavřena a ponechána při pokojové teplotě. Výsledek byl hodnocen po 15 minutách.

Jako negativní výsledek byl hodnocen vzorek, u kterého se vytvořila jedna červená linie v horní části okénka na pozici kontroly.

Jako pozitivní výsledek byl hodnocen vzorek, u kterého se vytvořily červená linie na pozici kontroly i na pozici vzorku.

Kontrolní linie na pozici vzorku může nabývat různé intenzity podle množství prokazovaného antigenu ve vzorku.

Jako chybný by byl hodnocen výsledek vzorku, u kterého by se neobjevila žádná linie nebo by se objevila linie pouze na pozici vzorku, bez vytvoření kontrolní linie. V takovém případě je nutné opakovat vyšetření.

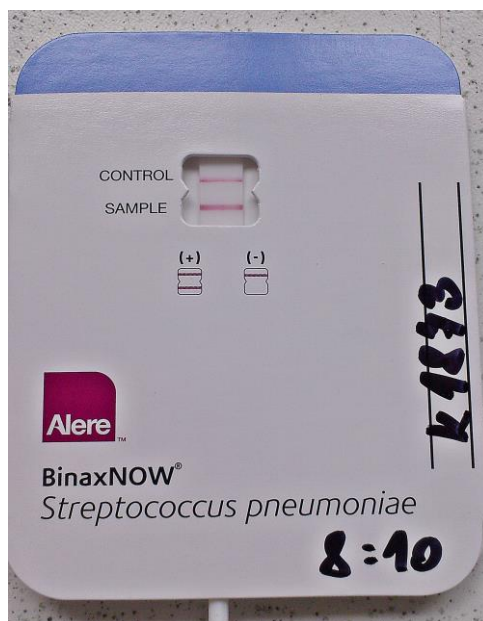
Pozitivní výsledek, tedy prokázaný antigen *S. pneumoniae* ve vzorku pacienta, ale i negativní výsledek, tedy antigen neprokázán, byl ihned telefonicky hlášen na oddělení požadující vyšetření.

Negativní výsledek znamená, že u pacienta neprobíhá pneumokoková infekce, nevylučuje však počátek pneumokokového onemocnění, kdy není antigen v moči ještě prezentován nebo jeho hladina ještě nepřesáhla prahové hodnoty testu.

Je doporučeno test neprovádět 5 dní po vakcinaci pneumokokem, může podávat falešně pozitivní výsledky.

Také vyšetření vzorku moči u dětí testem Binax Now *Streptococcus pneumonia* není doporučováno, z důvodu možnosti vykazování falešně pozitivních výsledků u dětí kolonizovaných *S. pneumoniae* (Příbalový leták Binax Now *Streptococcus pneumonia*, NCB\_PBAK\_PP\_12\_108\_A).

Obrázek 3: Imunochromatografická metoda Binax Now *Streptococcus pneumoniae*  
fa. ALERE (Zdroj: autorka)



### 3.2 Mikroskopie

V PBAK při zpracování výtěrů z nosu, nosohltanu a krku nebyla prováděna mikroskopie, vzhledem k nízké až nulové výpovědní hodnotě u těchto vzorků. U ostatních výtěrů např. z oka, z ucha a u materiálů tekutých např. likvor, hemokultura, sputum, bronchiální sekret byl mikroskopický preparát barvený dle Grama zhotoven.

Materiál na výtěrovém tampónu byl rozetřen na očíslované podložní sklíčko. U tekutých materiálů byla na podložní sklíčko nanesena jedna až dvě kapky biologického materiálu, rozetřena a ponechána do zaschnutí. Poté byly zaschlé nátěry ofixovány teplem, trojnásobným protažením podložního skla s preparátem skrze plamen kahanu. U některých tekutých materiálů, např. sputum, byla použita metoda chemické fixace, která spočívá v nanesení několika kapek methanolu na preparát a ponechání do zaschnutí.

Preparáty byly barveny automatickým barvicím systémem Mirastainer II (fa. Merck), umožňujícím obarvení až 30 preparátů v jednom procesu. Podložní sklíčka

s preparáty byla naskládána do stojánku a vložena do automatu se zvoleným barvením dle Grama. Barvicí přístroj využívá metody ponořování preparátů do jednotlivých lázní barvení. Postup barvení je podrobně popsán v tabulce 2.

Tabulka 2: Postup barvení dle Grama v barvicím automatu Mirastainer II

<b>Barvicí roztok - lázeň</b>	<b>Doba barvení</b>
roztok krystalové violeti	1 min 30 s
oplach vodou	30 s
Lugolův roztok	1 min 30 s
oplach vodou	30 s
aceton – odbarvovací roztok	30 s
oplach vodou	30 s
roztok karbolfuchsinu	30 s
oplach vodou	30 s

Preparáty byly v barvicím automatu vysušeny a následně prohlíženy v mikroskopu imerzním systémem.

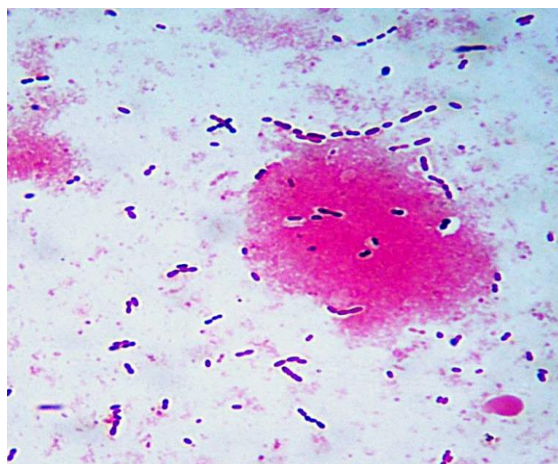
Bakterie byly rozděleny do základních tříd: grampozitivní koky, tyčky a gramnegativní koky, tyčky.

V mikroskopickém preparátu barveném podle Grama je *S. pneumoniae* dobře diagnostikovatelný jako grampozitivní koky ve dvojicích, které mají tvar lancety nebo plaménku.



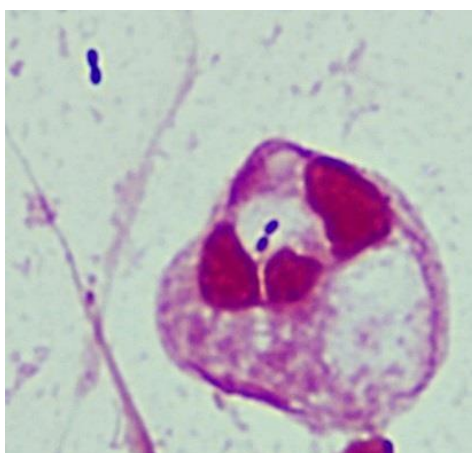
Obrázek 4: Opouzďřené, ovoidní, grampozitivní koky *S. pneumoniae* ve dvojicích

(Zdroj autorka)



Obrázek 5: Opouzďřené, ovoidní, grampozitivní koky *S. pneumoniae* ve dvojicích, fagocytované v leukocytu

(Zdroj autorka)



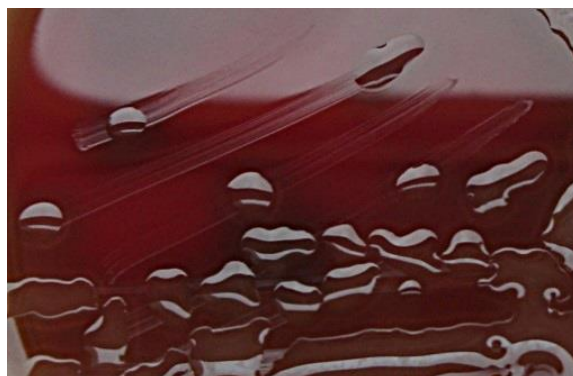
### 3.3 Kultivace

Ke kultivaci biologického materiálu byla v PBAK použita běžně užívaná kultivační půda krevní agar (CSB), obohacená 5% sterilní defibrinované ovčí krve (fa. BIO-RAD). Tato pevná kultivační média byla inkubována 18-24-48 hodin při  $36 \pm 1$  °C v atmosféře se zvýšenou tenzí CO<sub>2</sub> 5%.

Pneumokoky po inkubaci na krevním agaru byly pozorovány jako ploché někdy miskovité kolonie 2-3 mm velké s úzkou zónou alfa hemolýzy. Kolonie sérotypu 3 s výraznou schopností tvorby pouzdra, byly mírně větší, 3-5 mm, mukózní, šedo-zelené barvy, připomínající kapku oleje. Tento typ kolonií však nebyl příliš častý, nejčastěji byly identifikovány kolonie ploché až mírně vypouklé se zónou alfa hemolýzy, které jsou snadno zaměnitelné s viridujícími streptokoky, běžnou ústní flórou. Proto je nutné jejich vzájemné rozlišení dalšími identifikačními testy.

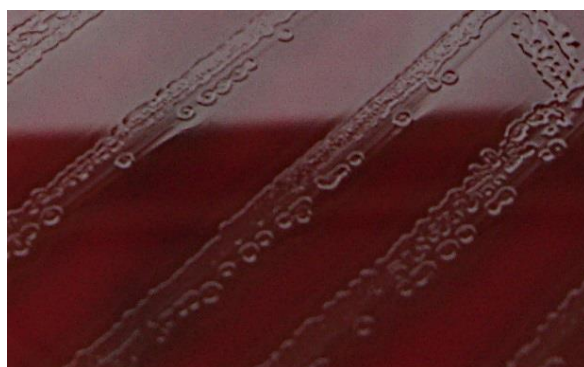
Obrázek 6: Kolonie serotypu 3 s výraznou schopností tvorby pouzdra

(Zdroj autorka)



Obrázek 7: Kolonie *S. pneumoniae* na krevním agaru

(Zdroj autorka)



### **3.3.1 Kultivace výtěrů z krku, nosu**

Výtěry z krku a nosu byly do PBAK transportovány na sterilních výtěrových tampónech v transportním médiu nebo na suchých, sterilních, výtěrových tampónech byly inokulovány na CSB. Inokulum bylo rozočkováno sterilní vypálenou kovovou kličkou nebo sterilní jednorázovou plastovou kličkou, do inokula byl vložen gentamicinový disk a sterilní kličkou byla provedena čára kmenem *Staphylococcus aureus* přes rozočkový vzorek. Inkubace probíhala 16-24 až 48 hodin při  $36\pm 1$  °C za zvýšené tenze CO<sub>2</sub>, po inkubaci byla hodnocena přítomnost bakteriální flóry a patogenních bakterií, u kterých byla provedena další identifikace a v případě nutnosti také citlivost bakterií k antimikrobiálním látkám (Isenberg 2007, NCB\_PBAK\_PP\_12\_163\_A).

### **3.3.2 Kultivace výtěrů z oka a ucha**

Výtěry z oka a ucha byly k vyšetření transportovány do PBAK na sterilních suchých výtěrových tampónech nebo na tampónech zanořených v transportním médiu. V laboratoři byly inokulovány na doporučené kultivační půdy (CSB, MacConkey agar, čokoládový agar, Müllerova půda a thioglykolátová pomnožovací půda – fa.BIO-RAD, fa.Dulab) a byl zhotoven mikroskopický preparát barvený dle Grama. Inokula byla rozočkována. Do inokula krevního agaru byl vložen gentamicinový disk a kultivační půdy byly inkubovány 16-24 až 48 hodin při  $36\pm 1$  °C za aerobní atmosféry, krevní agar a čokoládový agar byly kultivovány mikroaerofilně za zvýšené tenze CO<sub>2</sub>. Vyhodnocení mikroskopického vyšetření bylo provedeno v den příjmu materiálu do laboratoře. Kultivační půdy byly hodnoceny za 16-24 hodin a následně za 48 hodin. Pokud byl ve vyšetřovaném materiálu vyhodnocen suspektní původce infekce, byla u něho provedena následná identifikace a vyhodnocena citlivost patogena k antimikrobiálním látkám (Isenberg 2007, NCB\_PBAK\_PP\_12\_025).

### 3.3.3 Vyšetření vzorků z dolních dýchacích cest

Materiál z dolních dýchacích cest - sputum, bronchiální sekret, aspirát byl odebrán do sterilních jednorázových nádobek k tomu určených a transportován do laboratoře.

V Laboratoři lékařské mikrobiologie v PBAK bylo sputum zpracováno kvantitativní metodou. Nejprve bylo homogenizováno 2% roztokem broncholyzinu za přidání 4-5 sterilních skleněných kuliček a třepáno na třepačce 5-15 minut. Poté byl zhotoven nátěr na podložní sklíčko a po jeho zaschnutí byl chemicky šetrně fixován methanolem a obarven dle Grama v barvicím automatu. V mikroskopickém preparátu byl hodnocen poměr leukocytů a epitelii.

Pokud v zorném poli byl zjištěn počet epitelii 10 a více za přítomnosti různých typů mikroorganismů a pokud nepřevažoval jeden morfortyp mikroorganismů a nebyly přítomny leukocyty, pak nebyl vzorek kultivován, byl uchován v chladničce 48 hodin k případnému kultivačnímu zpracování vyžádanému ošetřujícím lékařem, i když podle odečtené mikroskopie se nejednalo o hnisavé sputum.

Pokud byla v zorném poli zjištěna převaha leukocytů nad epiteliemi více jak 2:1 nebo převažoval jeden typ mikroba, byla provedena kvantitativní kultivace vzorku.

Sputa již naředěná broncholisinem 1:1 byly dále ředěny:

- 1ml sputa + 4ml fyziologického roztoku = ředění  $10^{-1}$
- 0,1ml sputa  $10^{-1}$  + 9,9ml fyziologického roztoku = ředění  $10^{-3}$
- 0,1ml sputa  $10^{-3}$  + 9,9ml fyziologického roztoku = ředění  $10^{-5}$
- 0,1ml sputa  $10^{-5}$  + 9,9ml fyziologického roztoku = ředění  $10^{-7}$

Sputa naředěná  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  byly rozočkovány 10 $\mu$ l kličkou na třetinu pevných půd (CSB, čokoládový agar, MacConkey agar). Půda MacConkey byla inkubována aerobně při  $36\pm 1^\circ\text{C}$  a kultivační půda CSB a čokoládový agar byly inkubovány za zvýšené tenze  $\text{CO}_2$  při  $36\pm 1^\circ\text{C}$  16-24 až 48 hodin.

Počet mikrobů na 1ml byl hodnocen podle následující tabulky 3.

Tabulka 3: Počet mikrobů v 1ml vzorku

Ředění	Počet kolonií	Počet mikrobů / ml
$10^{-3}$	10	$10^6$
	100	$10^7$
$10^{-5}$	10	$10^8$
	100	$10^9$
$10^{-7}$	10	$10^{10}$
	100	$10^{11}$

K hodnocení vzorků byl na výsledkový list připojen následující komentář, vysvětlující počet mikrobů na 1ml:

- $10^6 - 10^7$  mikrobů/ml - pravděpodobně se nejedná o infekci dolních cest dýchacích (DCD)
- $10^8 - 10^9$  mikrobů/ml - pravděpodobně jde o infekci DCD
- $10^{10} - 10^{11}$  mikrobů/ml - jde o infekci DCD

V případě, že nebyl ve vzorku prokázán patogen, pouze běžná mikrobiální flóra horních dýchacích cest, kterou byl vzorek kontaminován při vykašlání, na výsledkový list nebyla udána u těchto bakterií kvantita (Isenberg 2007, Murray et al. 1999, Kunderová 2000, NCB\_PBAK\_PP\_12\_007).

Ostatní biologické materiály z dolních dýchacích cest jako je aspirát, bronchoalveolární laváž a bronchiální sekret byly do laboratoře transportovány ve sterilních odběrových nádobkách a byly zpracovány mikroskopickou a kultivační metodou. Pomocí sterilního tampónu byl materiál inokulován na pevné kultivační půdy (CSB, čokoládový agar, agar s kolistinem a kyselinou nalidixovou, MacConkey agar a Sabouraud agar – fa.BIO-RAD) a tekutou thioglykolátovou pomnožovací půdu (fa.Dulab). Byl také zhotoven mikroskopický preparát, který byl barven dle Grama, tento preparát byl hodnocen v den přijetí materiálu do laboratoře. Inokulum na pevných kultivačních půdách bylo rozočkováno. Na krevní agar se do inokula vložil gentamicinový disk a půdy (CSB, MacConkey agar, Sabouraud agar a tekutá

pomnožovací půda) byly inkubovány 18-24 až 48 hodin při  $36\pm 1$  °C v aerobní atmosféře, Sabouraudův agar byl inkubován až 72 hodin. Ostatní kultivační půdy (čokoládový agar, agar s kolistinem a kyselinou nalidixovou) byly inkubovány 18-24-48 až 72 hodin při  $36\pm 1$  °C mikroaerofilně za zvýšené tenze CO<sub>2</sub>. Po kultivaci byly všechny kultivační půdy vyhodnoceny, v případě nálezu suspektního původce infekce byla provedena jeho identifikace a také zhotovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám (Isenberg 2007, NCB\_PBAK\_PP\_12\_030).

### ***3.3.4 Laboratorní zpracování likvoru***

Likvor odebraný do sterilních nádobek byl co nejrychleji transportovaný do laboratoře. Nejprve byl hodnocen makroskopicky (barva a zákal), poté byl centrifugován 3 minuty při 1500 otáčkách. Po centrifugaci byl supernatant sterilně přenesen do sterilní skleněné zkumavky a uschován pro další případný přímý průkaz antigenu ve vzorku latexovou aglutinací. Ze sedimentu byl zhotoven mikroskopický preparát, který byl fixován třikrát protažením plamenem a barven v barvicím automatu dle Grama. V preparátu likvoru byla mikroskopicky posuzována přítomnost leukocytů a bakterií. Pozitivní nález bakterií byl hlášen na klinické pracoviště v co nejkratší době po přijetí materiálu do laboratoře.

Ve zkumavce se sedimentem bylo ponecháno 0,5 – 1ml supernatantu, kterým se resuspendoval sediment. Ten byl inokulován na pevná kultivační média (dva krevní agary, čokoládový agar, MacConkey agar) a také tekutá thioglykolátová pomnožovací půdu. Inokula na pevných půdách byla rozočkována po celé ploše kultivační půdy, do inokula krevního agaru byl vložen gentamicinový disk a půdy (jeden krevní agar, MacConkey agar a thioglykolátová půda) byly inkubovány 18-24 až 48 hodin při  $36\pm 1$  °C v aerobní atmosféře. Ostatní půdy (druhý krevní agar a čokoládový agar) byly inkubovány 18-24-48 až 72 hodin při  $36\pm 1$  °C v inkubátoru se zvýšeným přísunem CO<sub>2</sub>. V případě pozitivní kultivace byla provedena identifikace a zhotovena citlivost k antibiotikům (Isenberg 2007, NCB\_PBAK\_PP\_12\_028\_A).

### **3.3.5 Kultivace hemokultur**

Vzorky krve pro hemokultivaci jsou odebírány do speciálních hemokultivačních nádobek. Tyto nádoby jsou co nejdříve po odběru vkládány a kultivovány v automatickém systému Bact/Alert 3D (fa. bioMérieux).

Detekce pozitivních hemokultur je založena na kolorimetrickém stanovení oxidu uhličitého, jehož koncentrace v nádobce stoupá v případě bakteriálního růstu.

V případě signalizace pozitivivity hemokultury, bylo po vyjmutí nádoby z přístroje a dezinfekci zátky hemokultivační nádoby, odebráno tekuté médium, z něhož byl zhotoven mikroskopický preparát a naočkovány pevné kultivační půdy (CSB, MacConkey agar). V případě pozitivivity anaerobní nádoby byla inokulována i půda pro anaerobní kultivaci (Schaedler agar s vitamínem K3 a koňskou krví – fa. BIO-RAD).

Kultivační půdy pro aerobní kultivaci (CSB a MacConkey agar) byly inkubovány při  $36\pm 1$  °C, 18-24 až 48 hodin při aerobní atmosféře v termostatu, půda pro anaerobní kultivaci byla inkubována při  $36\pm 1$  °C, 48 hodin v anaerobním inkubátoru se stálou koncentrací kalibračního plynu, složeného z oxidu uhličitého, vodíku a dusíku (10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>). Po kultivaci byl vyhodnocen nárůst bakterií na kultivačních půdách, provedena jejich identifikace a stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám (Isenberg 2007, NCB\_PBAK\_PP\_12\_151).

### **3.4 Identifikace *Streptococcus pneumoniae***

K základní identifikaci alfa-hemolytických (viridujících) streptokoků slouží zhodnocení jejich morfologie na kultivačních půdách. K bližší identifikaci *S. pneumoniae* od ostatních alfa-hemolytických streptokoků byly v PBAK použity identifikační testy - citlivost k optochinu, rozpustnost ve žluči a v ojedinělých případech i hmotnostní spektrometrie.

### 3.4.1 Optochin test

Testované kolonie byly rovnoměrně a hustě naočkovány na krevní agar, do inokula byl sterilně položen disk s optochinem. Kultivační půda byla inkubována 18-24 hodin v inkubátoru za zvýšené tenze CO<sub>2</sub>, při 36±1 °C. Po inkubaci byla odečtena velikost inhibiční zóny, její vyhodnocení je znázorněno v tabulce 4 (Příbalový leták ITEST Optochin 2011, NCB\_PBAK\_PP\_12\_129\_A).

Tabulka 4: Hodnocení průměru inhibiční zóny

Velikost inhibiční zóny (mm)	Identifikace
≥ 14	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
0	viridující streptokoky jiné než <i>Streptococcus pneumoniae</i>
< 14	může se jednat o <i>Streptococcus pneumoniae</i> nutné potvrdit testem rozpustnosti ve žluči

Obrázek 8: Test citlivosti k optochinu

(Zdroj: autorka)

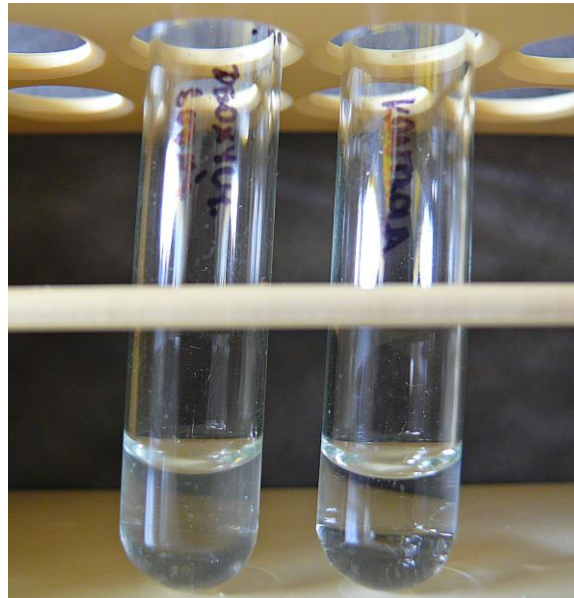




### 3.4.2 Deoxycholát sodný - test rozpustnosti ve žluči

Testovaný kmen byl resuspendován ve zkumavce s 1 ml fyziologického roztoku, tak aby densita suspenze dosahovala 1-2 stupně McFarlandovy zákalové stupnice. 0,5 ml roztoku bylo sterilně převedeno do druhé prázdné sterilní zkumavky. Jedna zkumavka se suspenzí byla zakápnuta 3 kapkami deoxycholátu sodného, druhá zkumavka bez deoxycholátu sodného byla použita jako kontrola testovaného kmene ve fyziologickém roztoku. Obě zkumavky byly inkubovány 30 minut při  $36\pm 1$  °C. Po inkubaci byl test vyhodnocen, pokud došlo k projasnění suspenze v testované zkumavce oproti kontrolní, byl testovaný kmen identifikován jako *S. pneumoniae*, pokud zákal testované suspenze zůstal beze změny, stejný jako v kontrolní zkumavce, byl testovaný kmen identifikován jako viridující streptokoky (Příbalový leták ITEST Deoxycholát sodný 2005, NCB\_PBAK\_PP\_12\_124\_A).

Obrázek 9: Test rozpustnosti ve žluči – deoxycholát sodný, kontrola (Zdroj: autorka)



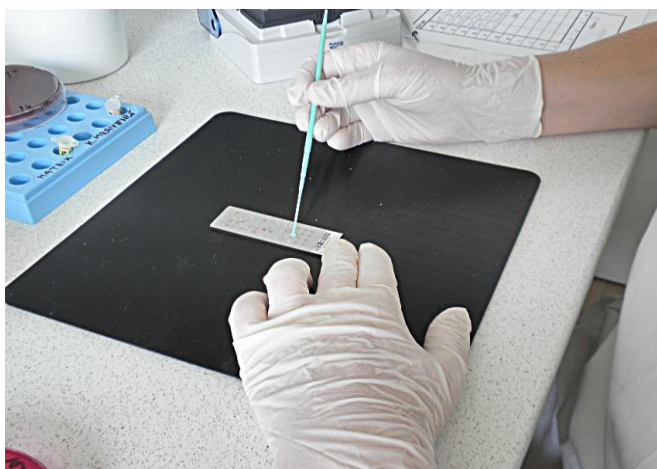
### 3.4.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS

V PBAK je využíván k identifikaci mikroorganismů hmotnostní spektrometr VITEK MS<sup>TM</sup> (fa. bioMérieux), který umožňuje testovat 48 až 192 vzorků v jedné analýze. Testovaný mikroorganismus z čerstvé kultury byl nanesen jednorázovou kličkou na nosič, na který byl také aplikován kalibrační kmen LyfoCults Plus *Escherichia coli* ATCC 8739. Na vzorek i kalibrační kmen byl aplikován 1  $\mu$ l matričního roztoku, který se nechal volně zaschnout. Takto připravený nosič byl vložen do analyzátoru a bylo provedeno měření testovaného kmene. Z měření byla získána spektra, která byla prostřednictvím vyhodnocovacího softwaru porovnána s databází spekter známých kmenů. Po porovnání spekter byla vypočítána procentuální pravděpodobnost vypovídající o míře shody vzorku s typickým spektrem daného mikroorganismu v databázi.

Při dokonalé shodě byla pravděpodobnost 99%. Za pravděpodobně správné bylo možné pokládat hodnoty 60 – 99%, pokud byla pravděpodobnost určení nižší než 60%, byl považován vzorek za neidentifikovaný. V případě nejednoznačně určeného jednoho druhu, byl systémem nabídnut seznam možných kmenů nebo byl vzorek označen jako neidentifikovaný, neodpovídal žádnému spektru v databázi (Postup návod k použití bioMérieux S.A., NCB\_PBAK\_PP\_12\_059\_A).

Obrázek 10: Příprava nosiče, nanesení testovaných kmenů pro identifikaci v analyzátoru VITEK MS<sup>TM</sup>

(Zdroj: autorka)



Obrázek 11: Nanesení matričního roztoku na jednotlivé testované kmeny

(Zdroj: autorka)



Obrázek 12: Hmotnostní spektrometr VITEK MS<sup>TM</sup> fa. bioMérieux (Zdroj: autorka)



### ***3.5 PCR pro průkaz DNA *S. pneumoniae****

Diagnostika nukleové kyseliny metodou PCR nebyla provedena v PBAK, výsledky průkazu DNA *S. pneumoniae* ve vzorcích likvoru byly do této práce poskytnuty Laboratoří molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice a.s.

## 4 Výsledky

V laboratoři lékařské mikrobiologie Nemocnice České Budějovice a.s. v PBAK se za období od listopadu 2012 až do února 2013 podařilo diagnostikovat 15x antigen *S. pneumoniae* bezkultivačním průkazem. V tomto období bylo izolováno 127 kmenů *S. pneumoniae* kultivační metodou od různých pacientů. V případech, kdy byl u některých pacientů *S. pneumoniae* kultivačně prokázán ve více vzorcích, byl do studie zahrnut pouze jeden kmen *S. pneumoniae*. Základní identifikace pneumokoků probíhala na základě mikroskopie u biologických materiálů, u kterých se mikroskopický průkaz provádí a makroskopické morfologie kolonií na kultivačních půdách. Všechny izolované kmeny *S. pneumoniae* byly podrobeny bližší identifikaci metodami optochin test a test rozpustnosti ve žluči – deoxycholát sodný. Pouze u velmi malého počtu kmenů, které morfologicky připomínaly spíše viridující streptokoky, byla v počátku použita k identifikaci metoda MALDI TOF MS. Dle doporučení výrobce, ale není tato metoda k identifikaci *S. pneumoniae* doporučována, vzhledem k velmi blízké genetické příbuznosti *Streptococcus oralis/mitis* a *Streptococcus pneumoniae*.

Metodou PCR byl prokázán *S. pneumoniae* v Laboratoři molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice a.s. v 5 vzorcích likvoru, odebraných z jednoho odběru jako pro bakteriologickou diagnostiku.

### 4.1 Průkaz antigenů *Streptococcus pneumoniae*

Metodou bezkultivačního průkazu bylo celkem prokázán 15x antigen *S. pneumoniae* v biologických materiálech - likvor, hemokultura, moč u 13 pacientů. Z toho byl 8x antigen *S. pneumoniae* prokázán metodou Binax Now *Streptococcus pneumoniae* (fa. Alere), 7 x byl pozitivní antigen latex aglutinační reakcí Pastorex<sup>TM</sup> Meningitidis (fa. BIO-RAD). V tabulce 4 jsou uvedeny diagnózy pacientů, u nichž byl prokázán antigen *S. pneumoniae* bezkultivačním průkazem, imunochromatografickou metodou a latex aglutinační reakcí.

Imunochromatografickou metodou Binax Now byl antigen *S. pneumoniae* v likvoru prokázán 2x u pacientů s diagnózou bakteriální meningitidy, 1x s diagnózou virové

meningitidy a 1x horečky, u vzorku moče byla uvedena diagnóza horečky také 1x, 1x se jednalo o akutní respirační selhání a 2x o pneumonii způsobenou jiným infekčním organismem.

Latex aglutinační reakcí byl antigen *S. pneumoniae* v likvoru prokázán 2x u pacientů s horečkou a 1x u pacienta s diagnózou neurčené virové infekce centrální nervové soustavy, v hemokultuře byl antigen *S. pneumoniae* diagnostikován u pacientů s horečkou 2x, s diagnózou dušnost 1x a 1x u zhoubného novotvaru průdušky a plíce.

Tabulka 5: Uvedené diagnózy u vyšetřovaných vzorků pacientů metodou Binax Now a Latex aglutinační reakcí

Uvedená <b>DIAGNÓZA</b> u vyšetřovaných vzorků	Prokázané antigeny metodou Binax Now ve vyšetřovaných vzorcích		
	likvor	hemokultura	moč
Bakteriální meningitida	2x	/	
Virová meningitida	1x	/	
Horečka	1x	/	1x
Akutní respirační selhání		/	1x
Pneumonie způsobená jiným infekčním organismem		/	2x
	Prokázané antigeny metodou latex aglutinační reakce ve vyšetřovaných vzorcích		
	likvor	hemokultura	moč
Horečka	2x	2x	/
Neurčená virová infekce centrální nervové soustavy	1x		/
Dušnost		1x	/
Zhoubný novotvar průdušky a plíce		1x	/

/ - U těchto biologických vzorků se průkaz antigenu neprováděl.

#### **4.1.1 Počet diagnostikovaných antigenů *S. pneumoniae* imunochromatografickou metodou**

Imunochromatografickou metodou Binax Now byl prokázán antigen 8x, z toho 4x v moči a 4x v likvoru. Ve dvou z těchto vzorků likvoru byl *S. pneumoniae* prokázán také kultivačně, v případě jednoho vzorku, se na žádost klinického pracoviště prokazoval také antigen v moči, který byl pozitivní. Čtvrtý vzorek likvoru byl také pozitivní v předchozím průkazu antigenu *S. pneumoniae* latex aglutinační reakcí. Vzhledem k slabé pozitivitě latexové aglutinace bylo potvrzení výsledku provedeno imunochromatografickou metodou.

#### **4.1.2 Počet diagnostikovaných antigenů *S. pneumoniae* latex aglutinační reakcí**

Latex aglutinační reakcí byl prokázán antigen *S. pneumoniae* 7x, z toho 4x z hemokultury. U třech těchto vzorků byl pozitivní také kultivační průkaz, u jedné hemokultury byla kultivace negativní, ale u tohoto pacienta byl antigen *S. pneumoniae* prokázán také metodou Binax Now ve vzorku moči. Dále byly 3 antigeny diagnostikovány v likvoru, u dvou z těchto likvorů byl pozitivní i kultivační průkaz, u jednoho byla kultivace negativní, ale antigen byl také prokázán imunochromatografickou metodou v tomtéž vzorku likvoru.

Tabulka 6: Počet diagnostikovaných antigenů u 13 pacientů

Vyšetřované vzorky	Počet prokázaných antigenů	
	Latex aglutinační reakce	Imunochromatografická metoda
hemokultura	4x	/
likvor	3x	4x
moč	/	4x

U žádného vzorku moči nebyla využita diagnostická metoda latex aglutinační reakce.

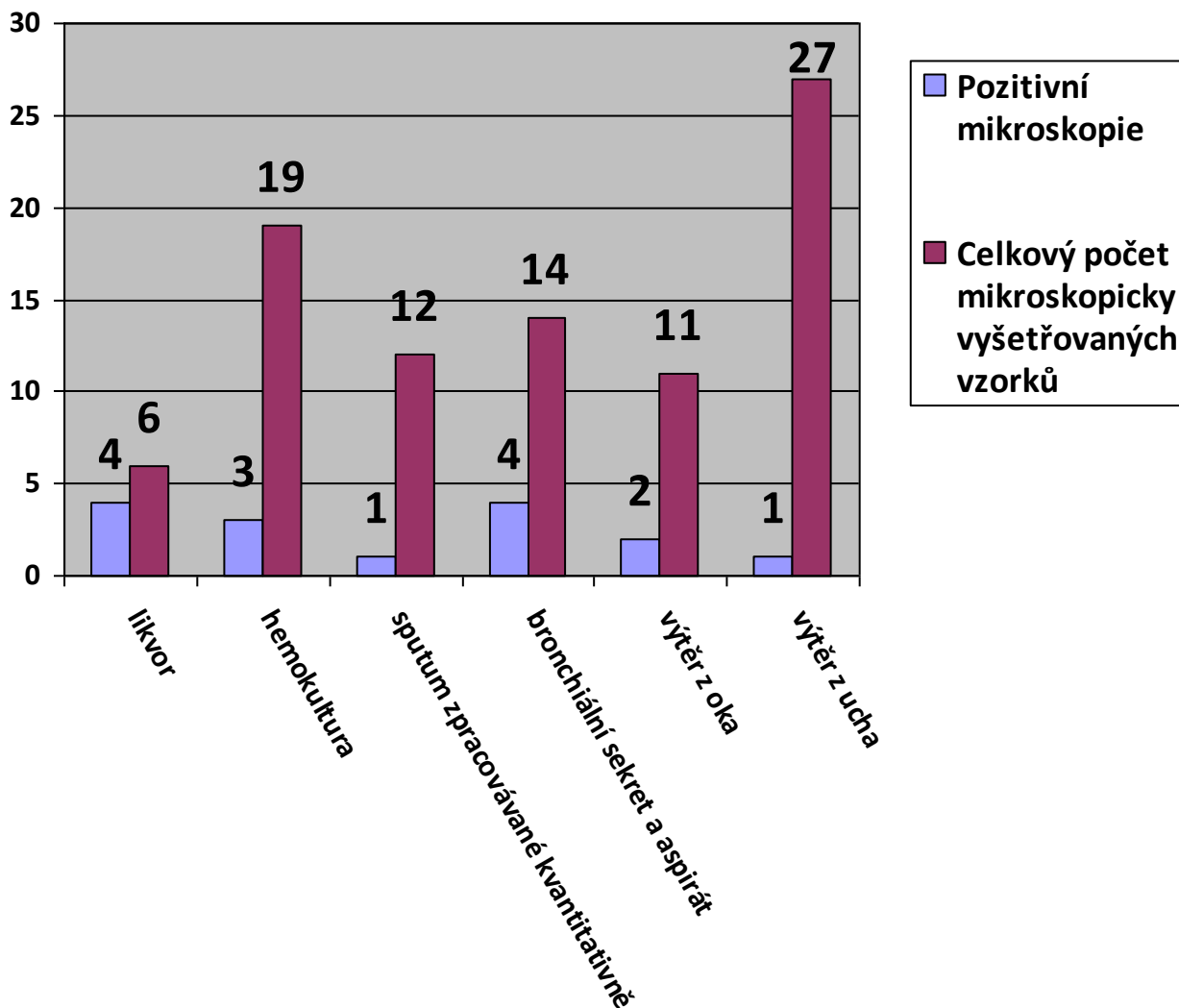
Imunochromatografickou metodu Binax Now nelze dle doporučení výrobce použít k průkazu antigenu v hemokultuře, tento test je validován pouze pro použití se vzorky moči a likvoru.

#### ***4.2 Mikroskopické nálezy vzorků s pozitivní kultivací *Streptococcus pneumoniae****

Mikroskopický průkaz *S. pneumoniae* byl indikován u 89 klinických vzorků. U výtěru z nosu a krku není mikroskopický průkaz opodstatněný, díky velké škále bakterií, které tuto oblast fyziologicky osidlují. V preparátu barveném dle Grama byly prokázány grampozitivní koky ve dvojicích lancetovitého tvaru u 4 vzorků likvoru z vyšetřovaných 6 vzorků, u 3 pozitivních hemokultur z vyšetřovaných 19 hemokultur. Mikroskopický průkaz byl pozitivní i u 1 sputa vyšetřovaného kvantitativní metodou z 12 testovaných, u 4 bronchiálních sekretů ze 14 vyšetřovaných, u 2 výtěrů z oka z testovaných 11 vzorků a u 1 výtěru z ucha z mikroskopicky vyšetřovaných 27 vzorků.



Graf 1: Počet pozitivních mikroskopických nálezů z celkového počtu 89 mikroskopicky vyšetřovaných vzorků



#### 4.3 Počty izolovaných kmenů *Streptococcus pneumoniae* z jednotlivých typů vzorků

Z celkem 127 izolovaných kmenů *S. pneumoniae* bylo nejvíce kmenů izolováno z výtěrů z nosu (36 kmenů), z ucha (27 kmenů), hemokultur (18 kmenů), z materiálu z dolních cest dýchacích bylo izolováno z bronchiálního sekretu a aspirátu (14 kmenů) a

ze sputa zpracovávaného kvantitativní metodou (12 kmenů), z výtěru z oka (11 kmenů), z výtěru krku (5 kmenů) a z likvoru (4 kmeny).

Tabulka 7: Počet izolovaných kmenů z biologických materiálů kultivačním průkazem

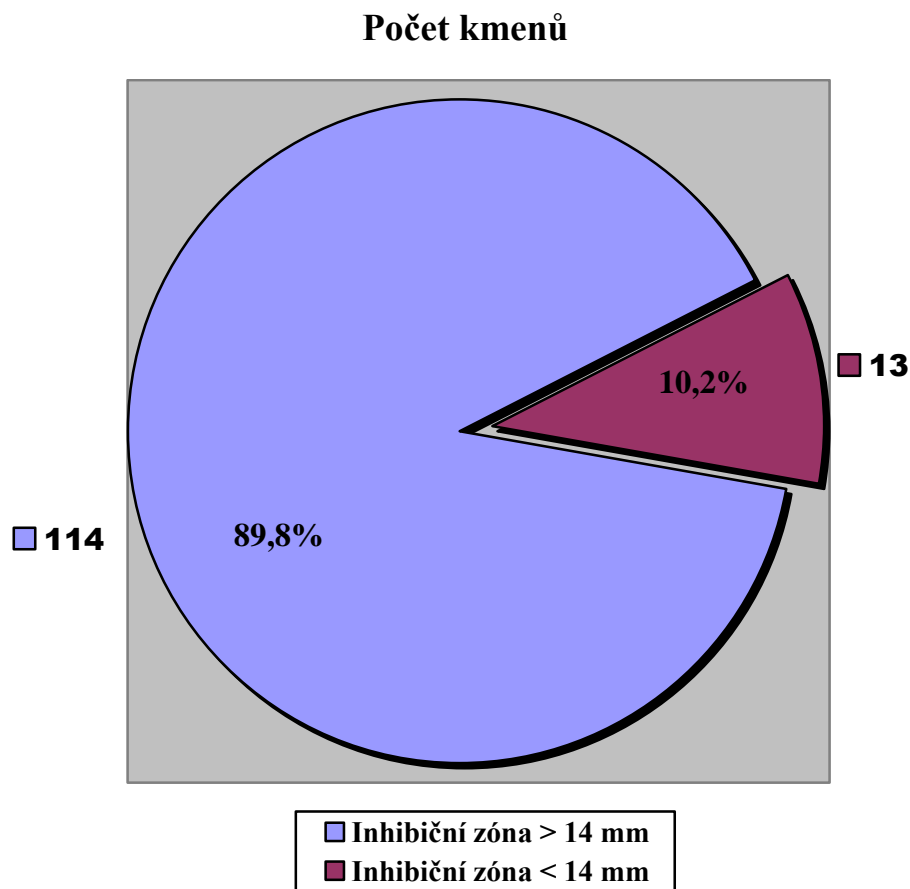
Druh vyšetřovaného materiálu	Počet izolovaných kmenů <i>S. pneumoniae</i>
výtěr z nosu	36
výtěr z ucha	27
hemokultury	18
bronchiální sekret a aspirát	14
sputum zpracovávané kvantitativní metodou	12
výtěr z oka	11
výtěr z krku	5
likvor	4

#### **4.4 Identifikace izolovaných kmenů *S. pneumoniae***

##### **4.4.1 Test citlivosti k optochinu**

Průkazem citlivosti k optochinu bylo testováno všech 127 suspektních kmenů. U 114 kmenů vyšel výsledek pozitivní, inhibiční zóna byla větší než 14 mm, tyto kmeny streptokoků s viridací byly určeny jako *S. pneumoniae*. 13 kmenů bylo k optochinu rezistentních, jak je znázorněno pomocí grafu 2.

Graf 2: Výsledky identifikace izolovaných kmenů metodou citlivosti k optochinu



Podle dosažených měření u 127 testovaných kmenů byla určena spolehlivost testu citlivost k optochinu, vztažena k pozitivnímu testu rozpustnosti ve žluči - deoxycholátem sodným, na 89,8%.

#### ***4.4.2 Metoda rozpustnosti ve žluči – deoxycholát sodný***

Identifikační metodou rozpustnosti ve žluči – deoxycholátem sodným bylo určeno 127 kultivačně získaných suspektních kmenů. U všech těchto kmenů byl výsledek testu pozitivní, tedy došlo k vyčerezení zákalu roztoku a rozpuštění bakteriální kultury resuspendované ve fyziologickém roztoku a zakapané deoxycholátem sodným. Zkumavka s rozpuštěnou bakteriální kulturou se hodnotila na základě kontroly, stejné

testované bakteriální kultury resuspendované pouze ve fyziologickém roztoku, u které nedošlo ke změně zátoku roztoku.

#### **4.4.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS**

Metodou hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS byly testovány pouze 4 bakteriální kultury viridujících streptokoků izolované z hemokultury.

*S. pneumoniae* byl diagnostikován ve dvou případech na 99,9% a dva izoláty se nepodařilo touto metodou identifikovat. U testovaných bakteriálních kultur se zároveň použily k identifikaci testy citlivost k optochinu a rozpustnost ve žluči – deoxycholát sodný, kterými byl diagnostikován *S. pneumoniae*.

Metoda hmotnostní spektrometrie byla použita jako možnost rychlé identifikace z 24 hodin staré bakteriální kultury, které nebylo dostatečné množství pro identifikaci testem rozpustnosti ve žluči.

#### **4.5 Průkaz DNA *S. pneumoniae* metodou PCR**

V Laboratoři molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice a.s. byl v 5 vzorcích likvoru, odebraných ve stejný den z jednoho odběru jako pro bakteriologickou diagnostiku, metodou PCR prokázán *S. pneumoniae*. V PBAK byly u 3 z těchto vzorků mikroskopicky odečteny grampozitivní koky ve dvojicích lancetovitého tvaru. U těchto vzorků byla zároveň pozitivní kultivace *S. pneumoniae*. Ve 2 zbývajících vzorcích likvoru byl prokázán antigen *S. pneumoniae* bezkultivačním průkazem.

U jednoho vzorku likvoru, u kterého v PBAK byla pozitivní mikroskopie, kultivace a také byl u tohoto likvoru prokázán antigen *S. pneumoniae* metodou Binax Now, nebylo indikováno vyšetření *S. pneumoniae* metodou PCR. Toto vyšetření bylo provedeno až z dalšího odběru mozkomíšního moku o 19 dnů později, DNA *S. pneumoniae* již prokázána nebyla.

Tabulka 8: Průkaz *S. pneumoniae* ve vzorcích likvoru z jednoho odběru zaslaných do Laboratoře molekulární biologie a genetiky a Pracoviště bakteriologie

	Laboratoř molekulární biologie a genetiky	Laboratoř lékařské mikrobiologie – Pracoviště bakteriologie		
	<b>Pozitivní průkaz u metod:</b>			
<b>Vyšetřovaný materiál</b>	<b>PCR metoda</b>	<b>Mikroskopický průkaz</b>	<b>Kultivační průkaz</b>	<b>Detekce antigenu bezkultivačním průkazem</b>
vzorek likvoru č. 1	+	+	+	
vzorek likvoru č. 2	+	+	+	
vzorek likvoru č. 3	+	+	+	
vzorek likvoru č. 4	+			+
vzorek likvoru č. 5	+			+

## 5 Diskuse

*Streptococcus pneumoniae* může být běžnou kolonizující flórou, ale může vyvolat celou škálu různých infekcí od život zpravidla neohrožujících až po velmi závažná invazivní onemocnění.

V současnosti je snaha o co nejrychlejší a nejpřesnější diagnostiku pneumokokových infekcí. Pro tuto rychlou diagnostiku se v laboratorní praxi již běžně užívají metody bezkultivačního průkazu antigenu *S. pneumoniae*, založené na imunochromatografických reakcích u diagnostiky pneumokokových pneumonií a meningitid. Další, již dříve užívanou metodou pro diagnostiku závažných invazivních pneumokokových onemocnění z klinických vzorků, je latex aglutinační reakce. Obě metody jsou vysoce specifické, podávající informaci o přítomnosti antigenu *S. pneumoniae* ve vzorcích likvoru, moče a hemokultury. Díky těmto dvěma metodám, byl antigen *S. pneumoniae* stanoven během krátkého časového úseku od příjmu vyšetřovaného materiálu do laboratoře a mohla být zahájena včasná antibiotická léčba pacienta, která využívá hlavně penicilin, jako lék volby pneumokokových infekcí. V dnešní době se mohou vyskytnout kmeny se sníženou citlivostí k penicilinu, případně rezistencí, proto by měla být rezistence kmenů ještě potvrzena stanovením citlivosti k antimikrobiálním látkám z izolovaného kmene.

K další diagnostice *S. pneumoniae* v biologických vzorcích byly využity metody mikroskopie a kultivace.

Mikroskopicky byly prokázány grampozitivní koky ve dvojicích lancetovitého tvaru u 15 vzorků z celkového počtu 89 mikroskopicky vyšetřovaných biologických vzorků, což souvisí s nižší citlivostí mikroskopie vzhledem ke kultivaci nebo bezkultivačním průkazům. Přesto je cennou diagnostickou metodou, umožňující vyslovit podezření na etiologii zvláště invazivního, pneumokokového onemocnění.

Kultivačním průkazem bylo izolováno 127 kmenů *S. pneumoniae*, které byly použity k další laboratorní identifikaci. Úspěšná kultivace může být ale významně ovlivněna již započatou antibiotickou léčbou pacienta. To bylo také potvrzeno v této práci, kdy bezkultivačním průkazem byl diagnostikován 11x antigen *S. pneumoniae* ve vzorcích likvoru a hemokultury, ale kultivace byla úspěšná pouze u 7 vzorků.

Základním diagnostickým testem pro identifikaci *S. pneumoniae* je metoda rozpustnosti ve žluči – deoxycholát sodný, která byla použita z čisté, dostatečně narostlé kultury. V případě smíšené kultury byl nejprve použit test citlivosti k optochinu, který poskytl dostatečné množství testovaného kmene pro případnou další identifikaci metodou rozpustnosti ve žluči, u kmenů s hraniční inhibiční zónou citlivosti k optochinu.

Metodou průkazu citlivosti k optochinu bylo identifikováno 114 kmenů *S. pneumoniae* ze 127 testovaných kmenů. 13 kmenů rezistentních k optochinu bylo konfirmačním testem rozpustnosti ve žluči identifikováno jako *S. pneumoniae*. Z tohoto porovnání identifikace testovaných kmenů vyplývá, že se mohlo jednat o kmeny *S. pneumoniae* rezistentní k optochinu. Tyto výsledky potvrzují odborná doporučení pro použití testu citlivosti k optochinu pro odlišení *S. pneumoniae* od ostatních viridujících streptokoků. Test citlivosti k optochinu lze použít jako orientační test, který je nutné ještě potvrdit dalším testem k průkazu *S. pneumoniae* u testovaných kmenů, které vykazují hraniční inhibiční zónu v citlivosti k optochinu. Test citlivosti k optochinu, také nelze využít k rychlé diagnostice *S. pneumoniae* z izolovaných kultur při podezření na závažná invazivní onemocnění pacientů, pro nutnost 18 – 24 hodinové kultivace testovaných kmenů.

Hmotnostní spektrometrie byla použita pouze u 4 bakteriálních kultur viridujících streptokoků izolovaných z hemokultury, jako možnost rychlé identifikace v závažném, biologickém, primárně sterilním materiálu. U dvou z těchto kultur byl identifikován *S. pneumoniae* na 99,9% a další dva testované kmeny se nepodařilo identifikovat, což můžeme hodnotit, jako nesprávné zpracování nebo nanesení vzorku nebo tím, že získaná spektra neodpovídala žádnému organismu v databázi MALDI TOF MS. U těchto testovaných bakteriálních kultur se ještě použily k identifikaci testy rozpustnosti ve žluči – deoxycholát sodný a citlivost k optochinu, pomocí kterých byly kmeny identifikovány jako *S. pneumoniae*.

Metoda hmotnostní spektrometrie je v rutinní praxi velkým přínosem pro identifikaci bakteriálních kultur, díky své přesnosti a získání výsledků během krátkého časového horizontu, avšak pro plošnou diagnostiku pneumokoků není možné tuto

metodu zatím použít, z důvodu velmi blízkého genotypu *Streptococcus oralis/mitis* a *Streptococcus pneumoniae*.

Velkou specificitu také vykazuje metoda PCR k průkazu bakteriální DNA. Tato metoda je využívána v diagnostice pneumokokových infekcí především z primárně sterilních vzorků, např. u pneumokokové meningitidy z likvoru. Jedná se však o metodu, kterou nelze využít pro plošnou diagnostiku pneumokokových infekcí v různých biologických vzorcích, vzhledem k běžné přítomnosti *Streptococcus pneumoniae* na sliznici dýchacích cest.



## 6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit současné možnosti laboratorní diagnostiky pneumokokových infekcí, porovnat běžně užívané laboratorní metody k průkazu *S. pneumoniae* v klinických vzorcích a použití moderních technologií bakteriálního průkazu. Do práce bylo zahrnuto 15 prokázaných antigenů *S. pneumoniae* bezkultivačním průkazem a 127 izolovaných kmenů kultivačním průkazem z různých klinických vzorků za období od listopadu 2012 do února 2013.

K bezkultivačnímu průkazu antigenu *S. pneumoniae* byly v Laboratoři lékařské mikrobiologie použity dvě současně dostupné laboratorní metody, imunochromatografická metoda Binax Now, pro průkaz antigenu *S. pneumoniae* v likvoru a v moči a latex aglutinační reakce, kterou byl antigen prokázán v likvoru a hemokultuře.

Izoláty získané kultivačním průkazem byly identifikovány pomocí dvou běžně užívaných laboratorních testů citlivost k optochinu a rozpustnost ve žluči – deoxycholát sodný. V porovnání těchto dvou testů, byl test citlivosti k optochinu spolehlivý na 89,8%, podařilo se jím identifikovat 114 kmenů.

Díky odborným doporučením byla použita identifikační metoda hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS zajišťující v současné době v PBAK rychlou a spolehlivou identifikaci bakteriálních kultur, pouze u 4 kmenů, primárně identifikovaných jako viridující streptokoky izolované z hemokultury. Tato jinak přesná metoda má svá úskalí v obtížném odlišení *Streptococcus oralis/mitis* a *Streptococcus pneumoniae* z důvodu velmi blízkého genotypu, která by se mohla zlepšit dalším zdokonalováním referenčního spektra v databázi MALDI TOF MS.

Velkou spolehlivost prokázal průkaz DNA *S. pneumoniae* metodou PCR, která má v rutinním provozu význam hlavně u diagnostiky závažných invazivních pneumokokových onemocnění.

## 7 Seznam použité literatury

ALERE. *Binax Now Streptococcus pneumonia* – příbalový leták, 2008.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.

Beneš, J. *Infekční nemoci*. 2. rozš.vyd. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-726-2173-4.

bioMérieux S.A. *VITEK MS<sup>TM</sup>* - postup návod k použití, 2011.

BIO-RAD. *Pastorex<sup>TM</sup> Meningitis* – příbalový leták, 2008.

Coykendall, A.L. *Classification and identification of the viridans streptococci*. Clin Microbiol Rev. 2(3): 315-328, 1989.

Garcia, P., Allend, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., Solari, S. *Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI*. Rev Chilena Infectol. 29: 263-272, 2012.

Göpfertová, D., Janovská, D., Dohnal, K. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. 2. vyd. Praha: Triton, 1999. ISBN 80-7254-049-1.

Greenwood, D., Richard, C. S., Peutherer, J. F. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vyd. Překlad Jiří Schindler. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-716-9365-0.

Hotomi, M., Togawa, A., Takei, S., Sugita, G., Sugita, R., Kono, M., Fujimaki, Y., Kamide, Y., Uchizono, A., Kanasada, K., Sawada, S., Okitsu, N., Tanaka, Y., Saijo, Y., Yamanaka, N. *Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK-0901 test for detection of pneumococcal antigen in middle ear fluids and nasopharyngeal secretions*. PLoS One. 7: e33620, 2012.

Ikryannikova, L.N., Filimonova, A.V., Malakhova, M.V., Savinova, T., Filimonova, O., Ilina, E.N., Dubovickaya, V.A., Sidorenko, S.V., Govorun, V.M. *Discrimination between Streptococcus pneumoniae and Streptococcus mitis based on sorting of their MALDI mass spectra*. Clin Microbiol Infect. 19(11): 1066-71, 2013.

Isenberg, H.D. (ed.). *Clinical Mikrobiology Procedures Handbook*. 2<sup>nd</sup> edition, 2007.

ITEST. *Deoxycholát sodný – příbalový leták*, 2005.

ITEST. *Optochin – příbalový leták*, 2011.

Kok, J., Thomas, L.C., Olma, T., Chen, S.C., Iredell, J.R. *Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry*. PLoS One. 6(8):e23285, 2011.

Kunderová, H. *Kvantitativní zpracování sputa jako metoda pro zlepšení diagnostiky infekcí dolních cest dýchacích*. Remedia Klin Mikrobiol. 4(1): 16-18, 2000.

Le Monnier, A., Carbonnelle, E., Zahar, J.R., Le Bourgeois, M., Abachin, E., Quesne, G., Varon, E., Descamps, P., De Blic, J., Scheinmann, P., Berche, P., Ferroni, A. *Microbiological diagnosis of empyema in children: comparative evaluations by culture, polymerase chain reaction and pneumococcal antigen detection in pleural fluids*. Clin Infect Dis. 42: 1135-1140, 2006.

Matos, J.de A., Madureira, D.J., Rebelo, M.C., Hofer, C.B., Barroso, D.E.

*Diagnosis of Streptococcus pneumoniae meningitis by polymerase chain reaction amplification of the gene for pneumolysin.* Mem Inst Oswaldo Cruz. 101: 559-63, 2006.

Murray, P.R., Baron, E.J. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2003, 2 v. ISBN 15-558-1255-4.

Mustafa, M.I., Al-Marzooq, F., How, S.H., Kuan, Y.C., Ng, T.H. *The use of multiplex real-time PCR improves the detection of the bacterial etiology of community acquired pneumonia.* Tropical Biomedicine. 28: 531–544, 2011.

NCB\_PBAK\_PP\_12\_007. *Postup zpracování sputa a bronchiálního sekretu kvantitativní metodou.* Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

NCB\_PBAK\_PP\_12\_025\_A. *Zpracování klinického materiálu – výtěry a stěry – aerobní a anaerobní zpracování.* Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

NCB\_PBAK\_PP\_12\_028\_A. *Zpracování klinického materiálu – likvor, sérum.* Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

NCB\_PBAK\_PP\_12\_030. *Zpracování materiálu z dolních cest dýchacích.* Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

NCB\_PBAK\_PP\_12\_059\_A. *Identifikace mikroorganismů metodou hmotnostní spektrometrie analyzátořem VITEK MS.* Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

NCB\_PBAK\_PP\_12\_108\_A. *Detekce antigenu Streptococcus pneumoniae imunochromatografickou metodou*. Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

NCB\_PBAK\_PP\_12\_124\_A. *Test rozpustnosti ve žluči*. Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

NCB\_PBAK\_PP\_12\_129\_A. *Optochin*. Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

NCB\_PBAK\_PP\_12\_149\_A. *Průkaz původců meningitid latexovou aglutinací*. Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

NCB\_PBAK\_PP\_12\_151. *Zpracování pozitivních hemokultur*. Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

NCB\_PBAK\_12\_163\_A. *Zpracování výtěru z krku a nosu*. Laboratoř lékařské mikrobiologie, Pracoviště bakteriologie, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.

Nolte, F.S. *Molecular diagnostics for detection of bacterial and viral pathogens in community-acquired pneumonia*. Clin Infect Dis. 47: 123-126, 2008.

Ramos-Sevillano, E., Moscoso, M., García, P., García, E., Yuste, J. *Nasopharyngeal Colonization and Invasive Disease Are Enhanced by the Cell Wall Hydrolases LytB and LytC of Streptococcus pneumoniae*. PLoS One. 6: e23626, 2011.

Risch, M., Radjenovic, D., Han, J.N., Wydler, M., Nydegger, U., Risch, L. *Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria*. Swiss Med Wkly. 140: w13095, 2010.

Richter, S.S., Heilmann, K.P., Dohrn, C.L., Riahi, F., Beekmann, S.E., Doern, G.V. *Accuracy of phenotypic methods for identification of Streptococcus pneumoniae isolates included in surveillance programs.* Journal of Clinical Microbiology. 46: 2184-2188, 2008.

Rosón, B., Sabé, N.F., Carratalá, J., Verdaguer, R., Dorca, J., Manresa, F., Gudiol, F. *Contribution of a Urinary Antigen Assay (Binax NOW) to the Early Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia.* Clinical Infectious Diseases. 38: 222-226, 2004.

Scharfen, J. ml. *Diferenciální diagnostika v lékařské mikrobiologii.* 1. vyd. Praha: Nucleus, 2013. ISBN 978-80-87009-32-1.

Vacková, Z., Klímová, M., Kozáková, J. *Nová molekulární metoda a schéma typizace Streptococcus pneumonikae v České republice.* Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 22(1): 16-18, 2013.

Votava, M., Ondrovčík, P. *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie.* 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1998. ISBN 80-210-1805-4.

Votava, M., Obdržálek, V., Ondrovčík, P., Růžička, F., Zahradníček, O., Woznicová, V. *Lékařská mikrobiologie II.: Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii.* 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2272-8.

Votava, M. *Lékařská mikrobiologie obecná.* Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902896-2-2.

Votava, M. et al. *Lékařská mikrobiologie speciální.* Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.

Votava et al. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.

Werno, A.M., Murdoch, D.R. *Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease*. *Clinical Infectious Diseases*. 46: 926-32, 2008.