

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

Zdravotnická bioanalytika

**POROVNÁNÍ REFERENČNÍCH HODNOT
KREVNÍHO OBRAZU, DIFERENCIÁLU A CD ZNAKŮ
S HODNOTAMI IMUNOLOGICKÝCH PACIENTŮ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Hradec Králové 2010

Irena Procházková

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

vlastnoruční podpis autora

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala za trpělivost a odborné vedení paní
Mgr. Fátorové.

Obsah

1. ÚVOD.....	7
2. CÍL PRÁCE	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	8
3. 1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA VIRŮ.....	8
3.1.1. MORFOLOGIE VIRŮ	8
3.1.2. REPRODUKČNÍ CYKLUS	8
3.1.3. BUNĚČNÁ AKTIVACE SPOLEČNÁ PRO HERPETICKÉ VIRY	9
3.2. ROZDĚLENÍ HERPES VIRŮ.....	9
3.2.1. HERPES SIMPLEX VIRUS TYP 1 (HSV-1 HERPES LABIALIS A STOMATITIS HERPETICA).....	10
3.2.2. HERPES SIMPLEX VIRUS TYP 2 (HSV-2 HERPES GENITALIS).....	10
3.3. PROTIVIROVÁ IMUNITA	12
3.3.1. PROTIVIROVÉ PŮSOBENÍ SUBSETŮ T-LYMFOCYTŮ	12
3.3.2. PŮSOBENÍ VIRŮ V IMUNITNÍM SYSTÉMU	14
3.3.3. VIROVÉ INFEKCE A MODULACE IMUNITNÍHO SYSTÉMU	16
3.4. MEZIBUNĚČNÁ KOMUNIKACE.....	17
3.4.1. FUNKCE DENDRITICKÝCH BUNĚK.....	17
3.4.2. ZPRACOVÁNÍ A PREZENTACE ANTIGENU.....	17
3.4.3. AKTIVACE T-LYMFOCYTŮ A REGULACE B-LYMFOCYTŮ	18
3.5. STANOVENÍ SUBPOPULACE LYMFOCYTŮ POMOCÍ CD MARKERŮ ...	18
3.5.1. T-lymfocyty (CD3+).....	18
3.5.2. TH -lymfocyty, tzv. pomocné (CD3+/CD4+).....	19
3.5.3. TC -lymfocyty, tzv. cytotoxické (CD3+/CD8+)	19
3.5.4. B-LYMFOCYTY (CD20+).....	19
3.5.5. NK-BUŇKY, TZV. PŘIROZENÍ ZABÍJEČI (CD16+/CD56+)	19
3.6. KLASIFIKACE INFEKČÍ VYVOLANÝCH HSV	20

3.6.1. PRIMOINFEKCE - GINGIVOSTOMATITIS HERPETICA.....	20
3.6.2. PRIMOINFEKCE - HERPES GENITALIS.....	20
3.6.3. PRIMOINFEKCE - PŘÍMÁ INOKULACE HSV DO KŮŽE.....	20
3.6.4. PRIMOINFEKCE U NOVOROZENCE.....	20
3.6.5. RECIDIVUJÍCÍ HERPES LABIALIS	21
3.6.6. RECIDIVUJÍCÍ HERPETICKÁ GINGIVOSTOMATITIDA.....	21
3.6.7. RECIDIVUJÍCÍ HERPES GENITALIS	21
3.7. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA HSV	21
3.7.1. PŘÍMÉ DIAGNOSTICKÉ METODY	21
3.7.1.1. Kultivace viru na tkáňových kulturách	21
3.7.1.2. Průkaz virové DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)	22
3.7.1.3. Přímý průkaz virových antigenů v klinickém materiálu	22
3.7.2. NEPŘÍMÁ DIAGNOSTIKA	22
3.7.2.1. Vyšetření druhově specifických protilátek (anti-HSV)	22
3.7.2.2. Vyšetření typově specifických protilátek (anti-HSV-1 a anti-HSV-2)..	23
3.8. LÉČBA HERPES SIMPLEX VIRŮ	23
3.8.1. ANALOGA PYRIMIDINOVÝCH NUKLEOZIDŮ.....	23
3.8.2. ANALOGA PURINOVÝCH NUKLEOZIDŮ	24
3.8.3. ACYKlickÉ NUKLEOZIDY.....	24
3.8.4. OSTATNÍ VIROSTATIKA.....	24
3.8.5. VÝVOJ PREVENTIVNÍCH A TERAPEUTICKÝCH VAKCÍN	25
4. PRAKTICKÁ ČÁST	26
4.1. METODIKA A MATERIÁL	26
4.1.1. MĚŘENÍ CD ZNAKŮ NA CYTOMIXU FC 500.....	26
4.1.2. PŘÍPRAVA VZORKŮ K MĚŘENÍ NA CYTOMIXU FC 500	28
4.1.3. REFERENČNÍ HODNOTY STANOVENÝCH CD MARKERŮ.....	28
4.1.4. MĚŘENÍ KREVNÍHO OBRAZU NA CELLTACU F	30
4.1.5. Příprava vzorků k měření na Celltacu F.....	31
4.1.6. Referenční hodnoty leukocytů a subpopulací leukocytů	31

4.2. VÝSLEDKY	32
4.2.1. Statistické vyhodnocení	32
4.2.2. Statistické výstupy	32
5. DISKUSE A ZÁVĚR	36
6. SEZNAM ZRATEK	37
7. LITERATURA	39

1. ÚVOD

V dnešní vyspělé době je již medicína na velmi vysoké úrovni. Existují však onemocnění, se kterými si ještě v některých případech poradit neumí. Jedná se převážně o virová onemocnění. Přestože jsme vybaveni dokonalým soukolím imunitního systému, jsou tato onemocnění stále rozšířeným problémem. Některé kmeny virů velmi snadno mutují a stávají se rezistentními na stávající léčbu.

Imunologie je proto důležitým vědním oborem, který se od konce šedesátých let intenzivně rozvíjí a dnes má již v medicíně své nezastupitelné místo.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo porovnání hodnot leukocytů, diferenciálního počtu leukocytů a CD znaků na lymfocytech, u běžně se vyskytujícího infekčního onemocnění vyvolaného Herpes simplex, s hodnotami referenčními. Onemocnění způsobená herpes viry patří

k nejčastějším virovým onemocněním. Existuje celkem 8 druhů lidských herpetických virů, proto jsem do studie vybrala pouze onemocnění způsobená Herpes simplex virus typ 1 a Herpes simplex virus typ 2.

3. TEORETICKÁ ČÁST

Herpes viry (čeleď Herpesviridae) jsou obalené DNA viry, pro které je typické dlouhodobé přetrvávání, latence v nakaženém organismu. Patří mezi nejrozšířenější viry v živočišné populaci a jsou původci širokého spektra nemocí lidí i zvířat.

3. 1. Obecná charakteristika virů

Viry jsou organismy nebuněčné. Zralé virové partikule, dosahují velikosti 20 - 300 nm. Nemnoží se dělením, ale syntézou svých složek. V této syntéze jsou závislé na ribozómech hostitelské buňky. Jsou to tedy typičtí nitrobuněční parazité, využívající enzymatických aparátů buňky k svému pomnožení. Toho dosahují překrytím hostitelské genetické informace svojí vlastní, nebo integrací svého genomu do genomu hostitelské buňky. Virus nemůže existovat mimo buňku. Původ virů není zdaleka objasněn. Snad vznikly regresí původních buněk či paralelně s vytvářením buněčných linií nebo z genetického buněčného materiálu (1).

3.1.1. Morfologie virů

Mají nejrozmanitější, ale většinou pravidelný tvar, kulovitý, miskovitý či oválný, vláknitý, mnohdy připomínají zářící pravidelně uspořádaný mnohostěn. Virové partikule, tedy virion, se skládá z vnitřní části, kterou tvoří core /nukleotid/, nesoucí genetickou informaci ve formě RNA nebo DNA a z protomer uspořádané kapsidy, tvořící dohromady nukleokapsid a konečně ze zevní části viru, obalového povrchu (1).

3.1.2. Reprodukční cyklus

Tento cyklus může trvat řadu dnů či týdnů, ale může proběhnout bleskově do jedné hodiny. První fáze je adheze, tedy přilnutí virionu na vazebné buněčné místo, receptor, který má shodné zřetězení povrchových glykoproteidů jako sám virion.

V druhé etapě penetrace dochází na povrchové membráně virionu k metabolické explozi, virion proniká do buněčné protoplazmy porušenou membránou.

Další fází je svlékání virového obalu. Následuje transport virového genomu, nastává replikace u RNA virů v plazmě, u DNA partikul v jádře buňky.

Další etapou je syntéza komponent, realizovaná virovými enzymy. Uvolněná nukleová kyselina podřídí metabolismus buňky svým potřebám a přinutí buňku, aby namísto svých bílkovin a své nukleové kyseliny tvořila bílkoviny a struktury vetřelce.

Poté dochází k maturaci virionu, který se postupně organizuje kolem vláken nukleové kyseliny v nukleokapsidu, pak cytoplasmou proniká k buněčné membráně, kde přijímá svůj obal a dochází ke kompletizaci. Finální fáze je uvolnění virionu z buňky (1).

3.1.3. Buněčná aktivace společná pro herpetické viry

Po vazbě na membránový buněčný receptor aktivuje enzymatickou kaskádu. Dochází k aktivaci kináz, které fosforylují inhibitory jaderných faktorů, zvláště inhibitor faktoru NF-kB, který se váže na sekvence genomu, rozhodující o transkripci genetické informace. Virová genetická informace se buď integruje přímo do genomu hostitelské buňky, nebo v ní spočívá v podobě mimochromozomálních genů (episomů) (2).

3.2. Rozdělení herpes virů

Do skupiny herpetických virů dnes řadíme již 8 lidských patogenů. Herpes simplex virus typu 1 a 2 (HSV1, HSV2) viz obrázek č. 1 a 2, Varicella zoster virus (VZV), virus Epsteinova a Barrové (EBV), lidský cytomegalovirus (CMV), lidské herpetické viry 6 a 7 (HHV6, HHV7) a nedávno objevený herpetický virus 8 (HHV8) (3).

Jejich charakteristickou vlastností je schopnost vyvolávat latentní infekci organismu spojenou s celoživotním nosičstvím viru a možnost reaktivace infekce za podmínek oslabení imunity hostitele, tedy i v průběhu těhotenství. Většina z nich je ubikvitně rozšířena. Možnost transplacentálního přenosu infekce z matky na plod byla dokumentována u HSV 1, 2, EBV, VZV, CMV a HHV6 (3).

3.2.1. Herpes simplex virus typ 1 (HSV-1 herpes labialis a stomatitis herpetica)

HSV virus je ubikvitně se vyskytující a jeho výhradním rezervoárem je člověk. Infekce HSV nevykazují žádné známky sezónnosti, bývají pozorované během celého roku. Doba inkubace se pohybuje od 1 do 26 dní, v průměru je to 6 - 8 dní. K přenosu viru dochází buď přímým dotykem aktivní léze ulcerativního typu nebo při styku se symptomatickým pacientem, který vylučuje HSV v sekretech. Infekční dávka HSV v kulturách získaných z aktivních lézí je 100 - 1000x vyšší než v kulturách získaných z genitálních sekretů či slin u osob asymptomaticky nakažených, proto i kontagiozita je mnohonásobně vyšší v symptomatické infekci onemocnění než v asymptomatické (4).

HSV-1 primární infekce se zpravidla pozorují v dětství, během prvních 5 let života. K přenosu dochází blízkým kontaktem rodičů či prarodičů. U několika málo procent osob, které nebyly nakaženy v dětství dochází k přenosu později v období puberty. U dětí se primární nákaza rozpoznává jen obtížně, většinou může být asymptomatická. Téměř u 90 – 95 % mladých dospělých, kteří se již s nákazou setkali v minulosti, bývají přítomné specifické protilátky. Přestože jejich hladina s časem klesá, lze jejich přítomnost detekovat ještě po 60 letech (4).

Situace výskytu HSV-1 nález je v České republice velmi obdobná jako ve světě. Potvrzuje se, že u většiny dospělé populace (osoby starší 18 let) došlo minimálně jednou k HSV-1 nález (4).

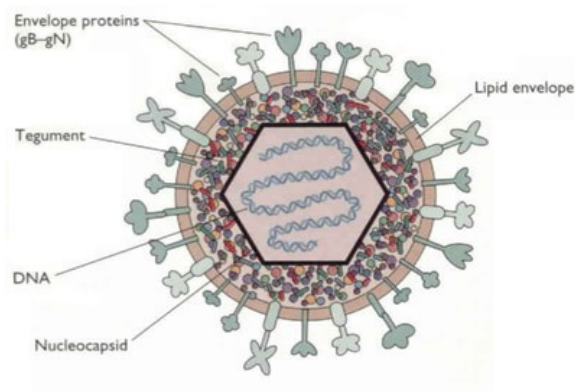
3.2.2. Herpes simplex virus typ 2 (HSV-2 herpes genitalis)

Vzhledem k tomu, že se tento typ nákazy přenáší sexuálně, objevují se s nástupem aktivního sexuálního života. V tomto věku již většina mladých osob prožila primární nákazu HSV-1 a získala jistou protektivní imunitu rovněž vůči HSV-2 infekci (4).

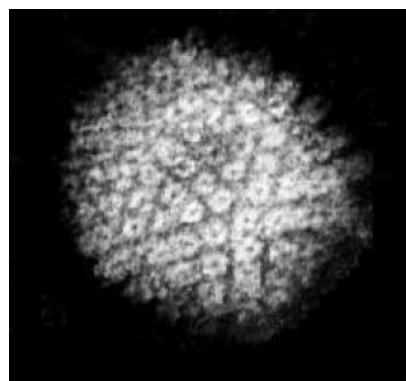
Epidemiologie HSV-2 nález je obtížně stanovitelná a výsledky takových studií nejsou přesné hned z několika důvodů. Tato infekce bývá velmi často asymptomatická, dále přibližně 10 – 40 % primárních genitálních HSV nález může být původu HSV-1 a nebo naopak a existuje zkřížená reaktivita mezi oběma typy HSV, která brání správnému přiřazení původce (4).

Prevalence HSV-2 infekcí bývá v průmyslově vyspělých státech různá. I přes jistá omezení lze udělat následující srovnání. Séroprevalence HSV-2 je obecně vyšší v populaci Spojených států amerických než v populaci národnostních států v Evropě. Významné rozdíly jsou navíc pozorovány i mezi jednotlivými národy v Evropě. Vyšší četnost HSV-2 byla zjištěna v severních státech nežli na jihu Evropy. V asijském a pacifickém regionu se zdá, že je séroprevalence HSV-2 nižší v Japonsku než v Austrálii. Obecně platí, že HSV-2 infekce se rychle šíří mezi mladými muži i ženami do 30 let. Navíc riziko přenosu se zvyšuje u osob s vysoce rizikovým sexuálním chováním. Další studie prováděné bez ohledu na populaci a geografii ukazují, že HSV-2 prevalence se zvyšuje s věkem a protilátky bývají častější u žen než u mužů (4).

Obdobná situace jako ve světě a v Evropě byla zjištěna i v České republice. I když sérologické přehledy neprokázaly statisticky významné rozdíly v séroprevalenci HSV-2 specifických protilátek v závislosti na pohlaví bez ohledu na věk, detailní analýzy vykazují preferenci častější HSV-2 nákazy u českých žen než u českých mužů. Dokonce i socioekonomické podmínky mají vliv na incidenci této nákazy (4).



Obrázek č.1 Herpes simplex virus



Obrázek č.2 Herpes simplex virus

3.3. Protivirová imunita

Klíčové postavení v protivirové obraně zaujímá specifická buněčná imunita, určená optimálním působením imunoregulačních subsetů Th1 a Th2 T-lymfocytů. Viry interferují s imunitním systémem mnoha mechanismy. Využívají například pro svůj vstup membránové molekuly, které regulují specifickou imunitu (CD4), přirozenou imunitu (CD21) i buněčnou migraci (receptory pro chemokiny). Viry blokuji přirozenou cytotoxickou reaktivitu a zasahují do zpracování a prezentace antigenů T-lymfocytům. Jsou schopny účinného zásahu do mezibuněčné komunikace zprostředkované cytokiny. Virové infekce mohou být příčinou maligní transformace buňky a podílejí se i na indukci autoimunitní imunopatologické reaktivity (5).

3.3.1. Protivirové působení subsetů T-lymfocytů

Obdobnými efektorovými mechanismy jako NK buňky usmrcují virem infikované buňky také CD8⁺ cytotoxické T-lymfocyty. Rozdíl vůči NK buňkám je ve způsobu rozpoznávání virem infikovaných buněk. Cytotoxické T-lymfocyty specificky rozpoznávají virové antigenní peptidy, které jsou vyjádřeny na infikované buňce po vazbě na molekuly I. třídy HLA (5).

Cytotoxická aktivita T-lymfocytů, stejně jako NK buněk, je regulována prostřednictvím cytokinů. V případě NK buněk jsou buňky ovlivněné cytokiny (IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, interferony) označovány jako lymfokinem aktivované zabíječské buňky (LAK) .

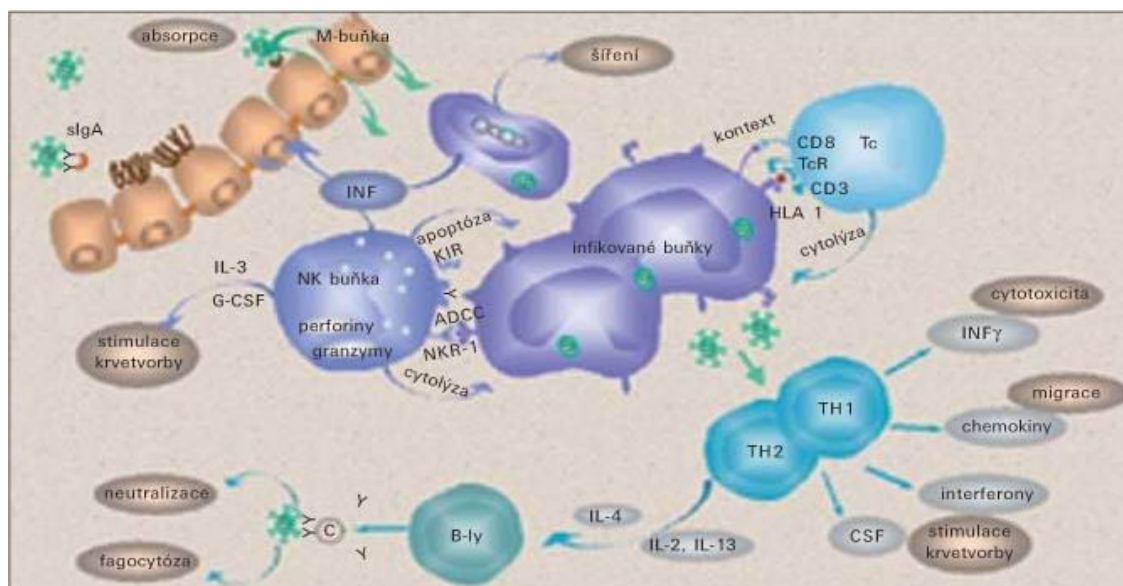
Protivirové působení T-lymfocytů je řízeno prostřednictvím imunoregulačních subsetů T-lymfocytů. Z imunokompetentního T-lymfocytu se po styku s antigenem pod vlivem řady proměnných faktorů diferencuje subset Th1 T-lymfocytů, který je charakterizovaný produkcí INF γ . Pro subset Th2 T-lymfocytů je typická produkce IL-4 (5).

Imunoregulační subsety T-lymfocytů jsou vzájemně v protichůdném funkčním postavení. Subset Th1 typický cytotoxickou reaktivitou je odpovědný za eliminaci virem infikovaných buněk. Subset Th2 reguluje diferenciaci B-lymfocytů, tvorbu specifických protilátek a izotypové přepnutí syntézy těžkých řetězců imunoglobulinů. Mechanismy protivirové imunitní odpovědi jsou souhrnně uvedeny na obr. č. 3 (5).

V místě imunitní reakce se tvoří zároveň jak typ Th1, tak Th2. cytokinem, který určuje diferenciaci (IFN- γ , IL-12a IL-4). Interleukiny obou subpopulací mají navzájem částečně antagonistické funkce. Útlum Th1 vede ke snížení sekrece INF- γ , který za normálních okolností potlačuje rozvoj Th2 lymfocytů (6).

Za velmi významnou je třeba považovat skutečnost, že podle nejnovějších údajů mohou cytotoxické T-lymfocyty eliminovat nitrobuněčnou virovou infekci, aniž došlo k cytotoxické likvidaci virem infikované buňky (5).

Buňky některých orgánů mají prokazatelně zvýšenou expresi proapoptotické membránové molekuly Apo/FasL (CD154). Imunokompetentní buňky, zvláště lymfocyty, které v průběhu protivirové obrany migrují do privilegovaných míst, nesou na svém povrchu proapoptotické molekuly, např. Apo/Fas (CD95). Vazba Apo/Fas ligandu na tyto receptory způsobuje apoptózu imunokompetentních buněk. Virus přítomný v imunoprivilegovaných místech je tak chráněn před působením například cytotoxických T-lymfocytů (5).



Obrázek č. 3 Protivirová imunita

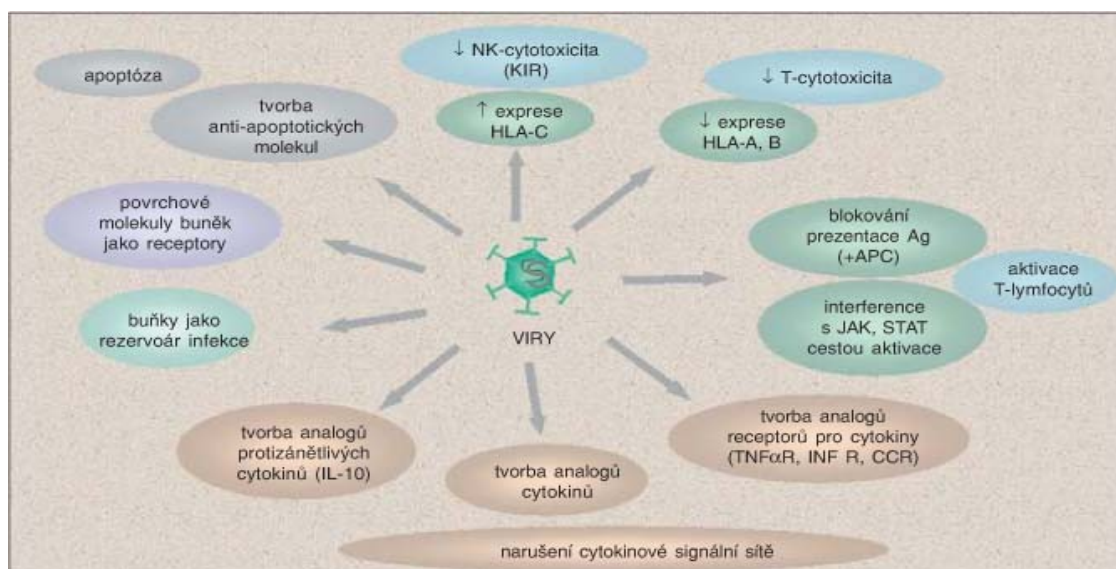
3.3.2. Působení virů v imunitním systému

Virová agens si vytvořila mnoho mechanismů (obr. č. 4), kterými se brání účinkům imunitního systému.

Velmi závažným průvodním rysem virových infekcí je skutečnost, že replikace virů je charakterizována značnou frekvencí genetických chyb, které mění biologické vlastnosti virových částic, zvláště jejich antigenní vybavení. (5).

Akumulace bodových mutací v genech pro hemaglutinin a neuraminidázu je označována jako antigenní drift. Antigenní shift je úplná změna v antigenních vlastnostech virového hemaglutininu, popřípadě i neuraminidázy. Lze konstatovat, že genetická, a tedy antigenní proměnlivost virových agens si obvykle udržuje náskok před imunitním systémem (5).

Virová agens pro vstup do hostitelské buňky využívají povrchové struktury, které jsou často velmi významné pro funkci imunologicky kompetentních buněk. Tyto viry jsou schopny „odmaskovat“ jejich buněčné receptory. Některé viry využívají pro vstup do hostitelské buňky povrchové molekuly, které jsou významnou součástí mechanismů nespecifické imunity. Virová agens tak výrazně zasahují do regulací komplementu. Na vstupu virů do buňky se podílejí i adhezní molekuly (5).



Obrázek č. 4 Virové mechanismy úniku imunitnímu dozoru

Viry mohou interferovat s aktivitou NK buněk například tím, napodobují přítomnost molekul HLA I. třídy a tak blokují cytotoxické působení NK buněk. Strukturně složitější viry, zvláště herpetické jsou schopny zasahovat do specifické T-lymfocytární cytotoxické reakce interferencí se zpracováním a prezentací antigenu. Několika způsoby snižují expresi molekul HLA I. třídy (5).

Velmi závažný dopad na protivirovou imunitu má schopnost mnohých virů manipulovat s cytokinovými signálními sítěmi tvorbou biologicky aktivních látek zvaných virokiny. Tuto schopnost opět mají strukturně složitě viry, například herpetické viry. Jejich vazbou je zablokována signální cesta. Zvláštní postavení v regulacích imunitního systému zaujímá IL-10, cytokin produkovaný TR (Th3 lymfocyty). Má schopnost tlumit cytotoxickou reaktivitu zprostředkovanou Th1 T-lymfocyty, která je pro protivirovou obranu klíčová. Herpetické viry produkují analogy receptorů pro cytokiny, které tlumí cytotoxickou aktivitu (5).

Buňky imunitního systému mohou sloužit jako rezervoár infekce. Mezibuněčný kontakt monocyto-makrofágových buněk při prezentaci a rozpoznání antigenu T-lymfocytům je tak těsný, že pravděpodobnost přenosu viru je značná.

Viry mají schopnost zasahovat do regulací apoptózy. Buněčná smrt indukovaná prostřednictvím apoptózy je výsledkem cytotoxického působení všech složek imunity, zvláště cytotoxických T-lymfocytů a NK buněk. Některé viry jsou schopny zamezit, nebo alespoň oddálit smrt hostitelské buňky apoptózou. Zabráněním apoptózy si viry uchovají potenciál buňky pro svoji replikaci (5).

3.3.3. Virové infekce a modulace imunitního systému

Viry zásadním způsobem ovlivnily vývoj člověka. Některé viry se staly integrální součástí lidského genomu a jsou předávány do dceřiných buněk. Expozice virovým infekcím nepochybně modifikovala imunologickou reaktivitu lidských populací. Působením virových infekcí je fyziologicky utlumována Th2 reaktivita, která převažuje v časném postnatálním vývoji jedince. Omezená nebo opožděná expozice virovým agens může mít negativní dopad na optimální vyvážení Th1 a Th2 reaktivity. Výsledkem může být indukce autoimunitní imunopatologické reaktivity (5).

3.4. Mezibuněčná komunikace

3.4.1. Funkce dendritických buněk

Mezibuněčná komunikace probíhá pomocí dendritických buněk (DC). DC je podskupina nervových buněk, exprimujících molekuly HLA II. třídy, specializovaná ke stimulaci naivních T-lymfocytů. Každý orgán kromě mozku, testes a centrální corney obsahuje DC v různém množství.

Typickou morfologickou charakteristikou jsou dendrity umožňující kontakt s mnoha lymfocyty. Konečný výsledek imunitní reakce může být indukce tolerance, nebo indukce imunitní reakce (7).

3.4.2. Zpracování a prezentace antigenu

Dendritické buňky tvoří komplex MHC molekuly a zpracovaného antigenu třemi způsoby.

1. DC pohltí exogenní Ag, který je degradován na polypeptidy v endozomech a navázan na molekulu MHC II. tř., která se vynoří na buněčném povrchu.

2. K cytotoxické reakci prostřednictvím $CD8^+$ T-lymfocytů je nutná prezentace antigenního peptidu na molekule MHC I. tř. Takto zpracováváný antigen je endogenního původu, pochází z proteinů produkovaných v buňce nebo z intracelulárních parazitů (virů). Kromě této klasické endogenní cesty, dokážou DC navázat na molekuly MHC I. tř. i exogenní antigeny. Proces se označuje jako cross-priming (7).

3. CD1 molekula je jedním ze základních povrchových markerů DC fenotypu a považuje se za neklasickou antigen prezentující molekulu (7).

3.4.3. Aktivace T-lymfocytů a regulace B-lymfocytů

Rozpoznání komplexu MHC-peptid na DC receptorem T-lymfocytu představuje „první signál“ v této interakci.

„Druhým signálem“ se označuje interakce mezi kostimulačními molekulami na DC a jejich ligandy na T-lymfocytech. Zprostředkován je adhezivními molekulami CD4+ lymfocytů. DC poskytují T-lymfocytům různé cytokinové mikroprostředí, které určí formu imunitní odpovědi.

DC buď přímo, pomocí IL-12 nebo receptoru pro IL-6, nebo nepřímo, regulací T-lymfocytů, aktivují naivní a paměťové B-lymfocyty. DC zpracují Ag v sekundárních lymfatických orgánech. Konečným výsledkem je diferenciace B-lymfocytů v plazmocyty produkující IgM (7).

Folikulární DC pravděpodobně nejsou hematopoetického původu a jsou schopny koncentrovat imunokomplexy. Tyto imunokomplexy jsou nabízeny B-lymfocytům ke zpracování a k prezentaci CD4+ T-lymfocytům. Tímto způsobem jsou pravděpodobně folikulární DC účastny udržování imunologické paměti (7).

3.5. Stanovení subpopulace lymfocytů pomocí CD markerů

Stanovení jednotlivých subpopulací lymfocytů se provádí imunofenotypizací, značením pomocí monoklonálních protilátek proti zjišťovaným CD znakům s následným stanovením na průtokovém cytometru.

3.5.1. T-lymfocyty (CD3+)

CD3+ subpopulace lymfocytů se zvyšuje u virových infekcí a hyperreaktivních imunopatologických stavů. Snížení počtu CD3+ lymfocytů má za následek vysokou nemocnost pacienta, zejména virové infekční zánětlivé procesy (8).

3.5.2. TH -lymfocyty, tzv. pomocné (CD3+/CD4+)

Tyto lymfocyty napomáhají charakterizaci imunodeficitů a autoimunitních onemocnění a slouží k monitorování HIV infekce. Zvýšené hodnoty bývají u autoimunitních onemocnění, alergií, expanze T-buněčné populace. Snížené hodnoty bývají u virových onemocnění jako jsou EBV infekce, CMV infekce či HIV infekce (8).

3.5.3. TC -lymfocyty, tzv. cytotoxické (CD3+/CD8+)

Subpopulace cytotoxických T-lymfocytů napomáhá charakterizaci imunodeficitů a autoimunitních onemocnění. Zvýšené hodnoty bývají u virových onemocnění (EBV infekce, CMV infekce, HIV infekce, HHV-6 infekce). Snížené hodnoty jsou u autoimunitních onemocnění a inhalačních alergií nebo i v případě chronického únavového syndromu (8).

Snížená hodnota imunoregulačního indexu CD4/CD8 je indikátorem snížené buněčné imunity se zvýšenou náchylností k určitým virovým, mykotickým, parazitárním a bakteriálním infekčním chorobám (8).

3.5.4. B-lymfocyty (CD20+)

Zvýšené hodnoty CD20+ lymfocytů bývají u B-buněčných leukémií a v případě aktivní produkce protilátek. Snížené hodnoty se vyskytují při nedostatečné protilátkové odpovědi (8).

3.5.5. NK-buňky, tzv. přirození zabijáci (CD16+/CD56+)

Zvýšené hodnoty CD16+/CD56+ buněk bývají u virových onemocnění, popř. maligních onemocnění. Snížené hodnoty pak u některých pacientů s chronickým únavovým syndromem.

NK buňky patří do skupiny lymfocytů s cytotoxickým působením. Jejich činnost je namířena zejména proti nádorovým buňkám. Zvláštností je, že na rozdíl od jiných buněk působí absolutně samostatně a na svoji činnost nepotřebují dostávat signály od jiných imunitních buněk. Jedna NK buňka za svůj život dokáže zlikvidovat až 27 nádorových buněk (9).

3.6. Klasifikace infekcí vyvolaných HSV

3.6.1. Primoinfekce - gingivostomatitis herpetica

Počátek onemocnění je spojen s necharakteristickými celkovými příznaky, jako je horečka, nechutenství, únava, bolesti hlavy, bolesti v krku a zvětšené, bolestivé submandibulární lymfatické uzliny. Po čtyřech dnech dochází ke spontánnímu ústupu celkových projevů při současném rychlém rozvoji generalizovaného intraorálního postižení. Jedná se o výsev velkého množství drobných puchýřků na zarudlé ústní sliznici, na sliznici gingivy, hřbetu jazyka a sliznici tvrdého patra. Puchýřky splývají, následně praskají a vznikají bolestivé eroze na sliznici, připomínající afty. Postižení červeně rtů a přilehlé periorální kůže není pravidlem (10).

3.6.2. Primoinfekce - herpes genitalis

V 75 – 95 % je původcem primoinfekce herpes genitalis HSV-2. Po inkubační době jednoho týdne dochází k herpetickému výsevu v genitoanální krajině. Postižení jedinci mohou mít zvýšenou teplotu, eventuálně horečku, slabost a oboustranné bolestivé zvětšení tříselných lymfatických uzlin. U žen je herpetickým výsevem postižena vulva, perineum, vagina, cervix uteri či uretra, u mužů bývá postižen glans penis.(10).

3.6.3. Primoinfekce - přímá inokulace HSV do kůže

Primoinfekce HSV vzniká zanesením viru HSV do abradované či normální kůže. Po jednotýdenní inkubační době dochází k výsevu herpetických vezikul, erozí a krust. Celkové příznaky jsou většinou nevýrazné. Obsah čirých puchýřků se rychle kalí, dochází k popraskání krytek puchýřků za vzniku hemoragických erozí. Typickým místem výskytu je obličej a krk, s přechodem na paže a trup (10).

3.6.4. Primoinfekce u novorozence

Primoinfekce novorozence může být získána kontaminovanými porodními cestami. Výsledkem je neonatální infekce, která má často fatální následky (10).

3.6.5. Recidivující herpes labialis

Nejčastější klinická forma recidivy HSV je infekce v orofaciální oblasti při perzistenci HSV v trigeminálním gangliu a jeho reaktivaci provokačními stimuly. Herpetickému výsevu předchází u většiny pacientů prodromy ve smyslu parestezií, jako jsou svědění, mravenčení, pálení až bolestivosti, většinou dolního rtu. Následuje výsev herpetických puchýřků, jejichž krytba se rychle strhává a vznikají bolestivé eroze. Onemocnění má rychlou tendenci ke spontánnímu zhojení, obvykle odeznívá do pěti dnů (10).

3.6.6. Recidivující herpetická gingivostomatitida

Vzniká reaktivací HSV s výsevem herpetických projevů na sliznici dutiny ústní. V klinickém obraze dominují silně bolestivé aftózní léze. Tendence ke spontánnímu zhojení je značná, obvykle dochází ke zhojení do 10 dnů (10).

3.6.7. Recidivující herpes genitalis

Tyto mají shodný klinický obraz jako primoinfekce herpes (10).

3.7. Laboratorní diagnostika HSV

Volba diagnostické metody se liší dle stadia infekce. Pokud jsou u pacienta přítomny vezikuly nebo ulcerace, dává se přednost přímému průkazu viru (10).

3.7.1. Přímé diagnostické metody

3.7.1.1. Kultivace viru na tkáňových kulturách

Vhodným materiálem pro kultivaci je stěr z puchýřku nebo vezikulární tekutina. Stěr se provádí sterilním tamponem, odebírá se co největší množství vezikulární tekutiny a buněk ze spodiny puchýřku, aniž by došlo ke kontaminaci krví. Stěry z puchýřků, na kterých je již vytvořena krusta, nebo z hnisavých ulcerací nejsou pro izolaci vhodné (11).

3.7.1.2. Průkaz virové DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)

Vhodným materiálem pro vyšetření PCR je opět stěr co největšího množství vezikulární tekutiny a buněk ze spodiny puchýřku provedený sterilním tampónem. Stírací tampon se vkládá do sterilní zkumavky s pufrovaným fyziologickým roztokem nebo s virologickým transportním médiem. Zkumavku s tampónem lze skladovat několik dní při +4 °C a transportovat do laboratoře při pokojové teplotě.

Vyšetření PCR je vhodné i pro průkaz viru v jiných klinických materiálech, které se vyšetřují při komplikacích genitálního herpesu. Například v mozkomíšním moku u pacientů s neurologickými komplikacemi, v krvi, biopsii, či bronchoalveolární laváži u imunodeficientních pacientů s generalizovaným herpesem s orgánovým postižením, dále v krvi, moči, stěru ze spojivkového vaku a nosohltanu u novorozenců se suspektní či manifestní kongenitální nebo perinatální infekcí (5).

3.7.1.3. Přímý průkaz virových antigenů v klinickém materiálu

Virové antigeny se prokazují na otiskových preparátech stěrů z ulcerací. Citlivost a specifita imunohistochemických metod je nižší než PCR nebo kultivace viru, proto se tyto metody považují za orientační a jejich výsledky je nutné konfirmovat kultivací či PCR (5).

3.7.2. Nepřímá diagnostika

Sérologickými testy lze stanovit protilátky tříd IgA, IgM a IgG, a to druhově specifické (společné pro HSV-1 a HSV-2) i typově specifické (odlišení HSV-1 a HSV-2 infekce) (5).

3.7.2.1. Vyšetření druhově specifických protilátek (anti-HSV)

Pro průkaz druhově specifických protilátek lze použít metodu ELISA, nepřímou imunofluorescenci nebo komplement-fixaci. Pro detekci IgM i IgA protilátek obvykle stačí kvalitativní testy, pro průkaz anamnestických protilátek, kde má význam i sledování jejich dynamiky, jsou vhodné testy kvantitativní (5).

3.7.2.2. Vyšetření typově specifických protilátek (anti-HSV-1 a anti-HSV-2)

Pro průkaz typově specifických protilátek lze použít testy ELISA obsahující typově specifický rekombinantní antigen (glykoprotein G). Vyšetření typově specifických protilátek u genitálního herpesu poskytuje informaci o riziku přenosu infekce nebo případně asymptomatického vylučování viru a může být přínosné při stanovení diagnózy u atypických lézí. Značný význam má vyšetření typově specifických protilátek (tj. anti-HSV-1 a anti-HSV-2) u gravidních žen, u nichž je důležité posouzení rizika infekce pro plod a novorozence. Při primoinfekci jsou typově specifické protilátky zachytitelné většinou později, než druhově specifické (5).

3.8. Léčba herpes simplex virů

S objasněním replikačního cyklu viru se objevují nové možnosti terapeutického zásahu. Vyvíjejí se nová virostatika s větším selektivním virostatickým účinkem. Prvním zlomem v léčbě infekcí Herpesvirus hominis (HSV-1 a HSV-2) bylo zavedení acykloviru. Virostatika užívaná před ním se vyznačovala vysokou toxicitou (5).

V případě zachycení prodromálního stadia jsou využívána virostatika lokální. Systémová virostatika podáváme především u pacientů, u kterých předpokládáme těžší průběh onemocnění, u pacientů imunosuprimovaných, s těžkými a recidivujícími infekcemi (více než 6 recidiv za rok). Cílem nasazení léčby je zabránění diseminace projevů, proto je vhodné včasné podání virostatik do 72 hodin od prvních příznaků. Virostatika lze z praktického hlediska dělit do čtyř podskupin (6).

3.8.1. Analoga pyrimidinových nukleozidů

Jde o skupinu nejdéle známých halogenovaných nukleozidových virostatik. Většina z nich je při celkovém podání silně myelotoxická, proto se využívají pouze k lokální léčbě herpetických onemocnění. Jedná se o preparáty Idoxuridin, Izopropyldeoxyuridin, Trifluridin a Brivudin (6).

3.8.2. Analoga purinových nukleozidů

Dihydropropyladenin je lokální virostatikum s účinkem srovnatelným s pyrimidinovými preparáty (6).

3.8.3. Acyklické nukleozidy

Acyklovir zabraňuje replikaci HSV v infikované buňce, aniž by negativně ovlivňoval zdravé buňky. Za přítomnosti virového enzymu tymidinkinázy je acyklovir po průniku do buňky fosforylován až na acyklovir-trifosfát, což je vlastní účinná látka. Ta se zabuduje do řetězce virové DNA a jako falešný substrát virové DNA-polymerázy inhibuje její replikaci. Pokud není v buňce virová tymidinkináza přítomna, nedochází k metabolizaci acykloviru na acyklovir-trifosfát a acyklovir je vyloučen z buňky. Acyklovir má nízkou biologickou dostupnost, při podání per os se acyklovir resorbuje z 20 %, při intravenózním podání rychle proniká do všech tkání včetně oka a centrálního nervového systému. Preparáty obsahující acyklovir jsou Herpesin, Provirsan, Ranvir, Zovirax (6).

Valacyklovir je esterem acykloviru s L-valínem. V organismu se metabolizuje na acyklovir (preparát Valtrex). Famcyklovir je guanozinový analog, který ve formě účinné látky pencyklovir-trifosfátu účinně blokuje replikaci HSV (preparát Famvir) (6).

3.8.4. Ostatní virostatika

Jedná se o skupinu strukturálně rozdílných látek s antivirovými účinky. Antiseptika s protivirovými účinky jako jsou např. Chlorhexidin nebo Jodoform. Síran zinečnatý má výrazný protivirový efekt na HSV. Má také slabý antibakteriální a adstringentní účinek (6).

Nemocné s herpetickými infekcemi HSV-1 a HSV-2 trápí časté recidivy onemocnění. Těmto recidivám nelze účinně zabránit. Nedílnou součástí terapie herpetických infekcí je dodržování doporučení, která omezí riziko nákazy. Nelíbat osoby s akutními projevy herpetické infekce, nesouložit bez kondomu s osobami s floridním herpetickým onemocněním a včas léčit všechny projevy herpetických infekcí (6).

3.8.5. Vývoj preventivních a terapeutických vakcín

Snahy o vytvoření účinné HSV vakcíny probíhají již více než 60 let. Byly zkoušeny inaktivované, rekombinantní, živé atenuované i DNA vakcíny. Do 3. stadia klinického zkoušení se dostaly celovirionové inaktivované vakcíny a glykoproteinové rekombinantní vakcíny. Ačkoli byly dobře tolerovány, výsledky profylaktického i terapeutického použití byly rozporuplné. V současnosti se rovněž intenzivně hledá vhodné adjuvans k rekombinantním vakcínám, které by stimulovalo především Th1 typ buněčné odpovědi. DNA vakcíny, zatím nepostoupily do 3. stadia klinického zkoušení (12).

4. PRAKTICKÁ ČÁST

U souboru 70 dospělých pacientů s typem diagnózy Herpes simplex virus 1 a Herpes simplex virus 2 jsem provedla vyšetření počtu leukocytů, diferenciálního počtu leukocytů a stanovení CD lymfocytárních znaků a výsledky jsem porovнала s průměrnými hodnotami zdravé dospělé populace.

4.1. Metodika a materiál

4.1.1. Měření CD znaků na Cytomixu FC 500

Ze spektra u nás měřených buněk jsem vybrala rozlišení základních znaků na lymfocytech, které je rozdělí na T a B lymfocyty a NK buňky. CD znaky na lymfocytech byly měřeny na průtokovém cytometru Cytomix FC 500 (obr. č. 5), který kvalitativně a kvantitativně měří biologické a fyzikální vlastnosti buněk. Tyto vlastnosti jsou měřeny, když procházejí jedna za druhou laserovými paprsky. Přístroj může současně měřit přímý a boční rozptyl laserového paprsku a pět fluorescenčních barviv za využití jednoho nebo dvou laserů při 488 – 635 nm.

Průtokový cytometr sestává ze tří základních, vzájemně propojených systémů. Fluidika zajišťuje transport buněk ze suspenze, které jedna za druhou postupně přicházejí do průtokové komory, když jsou předtím hydrodynamicky fokusovány hnací tekutinou do proudnice a konstantní rychlostí procházejí jednotlivými laserovými paprsky. Během tohoto průchodu paprskem fotonů excitačního záření dochází k detekci fluorescence a u jednoho z laserů i rozptylu záření. Optika zahrnuje excitační zdroje (lasery) a sběrné optické dráhy, které systémem čoček, zrcadel a optických filtrů zachycují fluorescenční a rozptýlené záření a přivádějí je na opticky aktivní vrstvu optoelektronických detektorů (fotonásobičů a fotodiod) tvořících rozhraní mezi optickým a elektronickým podsystémem průtokového cytometru (13).

Ke každému používanému laseru existuje celá skupina fluoroforů s dostatečně silnou absorpcí v dané oblasti světelného spektra a rozdílnou emisní charakteristikou tak, aby byla jejich fluorescence odlišitelná pomocí soustavy optických filtrů uzpůsobených k odrazu nebo prostupu fotonů s definovanou vlnovou délkou.

Označení suspenze buněk komplexním koktejlem monoklonálních protilátek, každé z nich vázané k jinému fluoroforu (tedy molekule s jinou barvou fluorescence), je základní princip vícebarevné (polychromatické) imunofenotypizace.

Polychromatickou imunofluorescencí pak nazýváme optický signál, který označené buňky po ozáření excitačním zářením jednoho nebo více laserů vydávají. Intenzita fluorescence jednotlivých buněk je v ideálním případě přímo úměrná množství navázané monoklonální protilátky (13).



Obrázek č.5 Cytomix FC 500

4.1.2. Příprava vzorků k měření na Cytomixu FC 500

K vyšetření používáme plnou krev s heparinem jako protisrážlivým prostředkem. Stabilita vzorku je při teplotě 20 až 25 °C 4 hodiny, při 4 °C 24 hodin. Krev nejdříve inkubujeme s monoklonální protilátkou proti CD znaku, který stanovujeme. Protilátky jsou firmy Exbio a Immunotech a jsou konjugovány fluorescenční značkou fluorescein izothiokyanátem (FITC) nebo phycoerythrinem (PE). Pro základní rozlišení lymfocytů používáme panel, pro který je nastaven průtokový cytometr. Do zkumavky s 25 μ l krve přidáme monoklonální protilátku proti CD3+ (PE-DY 647), CD4+ (PE), CD8+ (FITC) a pro kontrolu dosažení 100 % při součtu jednotlivých subpopulací CD45+ (PC7). V dalších dvou zkumavkách se inkubuje s krví monoklonální protilátka proti CD16+/CD56+ (FITC), a proti CD20+ (FITC).

Protilátkám po protřepání zkumavky stačí k navázání na antigen 15 minut. Po inkubaci při pokojové teplotě jsou ve zkumavkách lyzovány lyzačním roztokem erytrocyty, nežádoucí k měření. Během analýzy vzorku průtokovým cytometrem je detekována fluorescence jednotlivých buněk. Rozdíly v intenzitě fluorescence buněk umožňují separovat skupiny leukocytů na základě rozdílné exprese analyzovaného antigenu.

4.1.3. Referenční hodnoty stanovených CD markerů

Referenční hodnoty stanovených CD lymfocytárních znaků jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 Referenční hodnoty CD znaků subpopulací lymfocytů

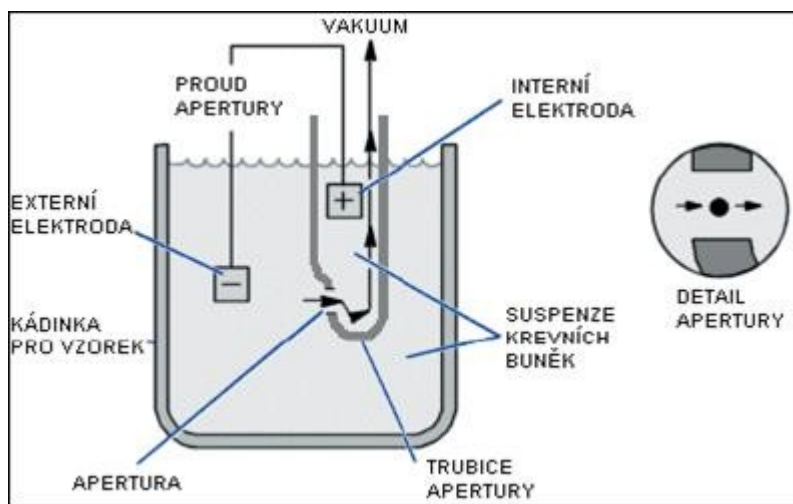
Parametr	Rozmezí	Jednotka
CD3+ T lymfocyty	65 – 80	%
Absolutní počet CD3+	1,3 – 1,7	$\times 10^9/l$
CD4+ TH lymfocyty	35 – 60	%
Absolutní počet CD4+	0,8 – 1,2	$\times 10^9/l$
CD8+ TC lymfocyty	15 – 35	%
Absolutní počet CD8+	0,4 – 0,7	$\times 10^9/l$
Abs. počet CD4+/CD8+	1,6 – 2,4	$\times 10^9/l$
CD20+ B lymfocyty	5 – 15	%
Absolutní počet CD20+	0,1 – 0,6	$\times 10^9/l$
CD3-/CD56+ NK buňky	7 – 21	%
Abs. počet NK buněk	0,1 - 0,6	$\times 10^9/l$

4.1.4. Měření krevního obrazu na Celltacu F

Automatický hematologický analyzátor firmy Nihon Kohden měří 22 parametrů, včetně celkového počtu leukocytů a rozlišení pěti základních druhů bílých krvinek.

Princip stanovení počtu leukocytů spočívá ve stanovení velikosti buňky zjištěním a změřením změn elektrického odporu, kdy částice ve vodivé kapalině prochází malou aperturou. Každá buňka suspendovaná ve vodivé kapalině (ředícím roztoku) funguje jako izolátor. Průchod každé jednotlivé buňky aperturou zvyšuje v daném okamžiku elektrický odpor mezi dvěma ponořenými elektrodami, umístěnými na obou stranách apertury. To vyvolá elektrický impuls, který lze načítat a měřit jeho velikost. Zatímco počet impulsů indikuje počet částic, velikost elektrického impulsu je úměrná buněčnému objemu (obr. č. 7).

Jednotlivé typy leukocytů jsou rozlišeny průtokovou cytometrií. Elektronika převádí optické signály, fluorescenci a rozptyl světla jednotlivých buněk, na signály elektronické, ty potom zesiluje a digitalizuje počty jednotlivých typů krevních buněk stanovuje metodou detekce změny elektrického odporu (14).



Obrázek č. 7 Stanovení velikosti a počtu částic

4.1.5. Příprava vzorků k měření na Celltacu F

Parametry krevního obrazu jsou měřeny z plné krve s protisrážlivým prostředkem K₂EDTA. Měření vzorku předchází dodržení zásad správné preanalytiky. Před vlastním měřením v analyzátoru se vzorky promíchají na valivé třepače. Zpracovat vzorky je doporučeno do 5 hodin po odběru.

4.1.6. Referenční hodnoty leukocytů a subpopulací leukocytů

Referenční hodnoty leukocytů a subpopulací leukocytů v diferenciálním rozpočtu u zdravých dospělých osob jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 Referenční hodnoty počtu leukocytů a jednotlivých populací leukocytů

Parametr	Rozmezí	Jednotky
Leukocyty	3,8 - 10	x 10 ⁹ /l
Neutrofilní segmenty	40 - 75	%
Absolutní počet neutrofilů	2,6 - 5,5	x 10 ⁹ /l
Lymfocyty	25 - 45	%
Absolutní počet lymfocytů	1,5 - 4,5	x 10 ⁹ /l
Monocyty	0 - 12	%
Absolutní počet monocytů	0 - 1,3	x 10 ⁹ /l
Eosinofilní segmenty	0,5 - 8	%
Absolutní počet eozinofilů	0 - 0,7	x 10 ⁹ /l
Bazofilní segmenty	0 - 2	%

Absolutní počet bazofilů	0 - 0,02	$\times 10^9/l$
--------------------------	----------	-----------------

4.2. Výsledky

4.2.1. Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení získaných dat jsem použila parametrický jednovýběrový test ve statistickém programu Medcalc. Tento test slouží k porovnání průměrů jednotlivých naměřených parametrů u sledovaného souboru pacientů s průměrnou hodnotou dospělé zdravé populace získanou z referenčního rozmezí pro dané parametry (15).

Zároveň jsem provedla grafické porovnání průměrů jednotlivých měřených parametrů s průměrnou hodnotou dospělé zdravé populace.

4.2.2. Statistické výstupy

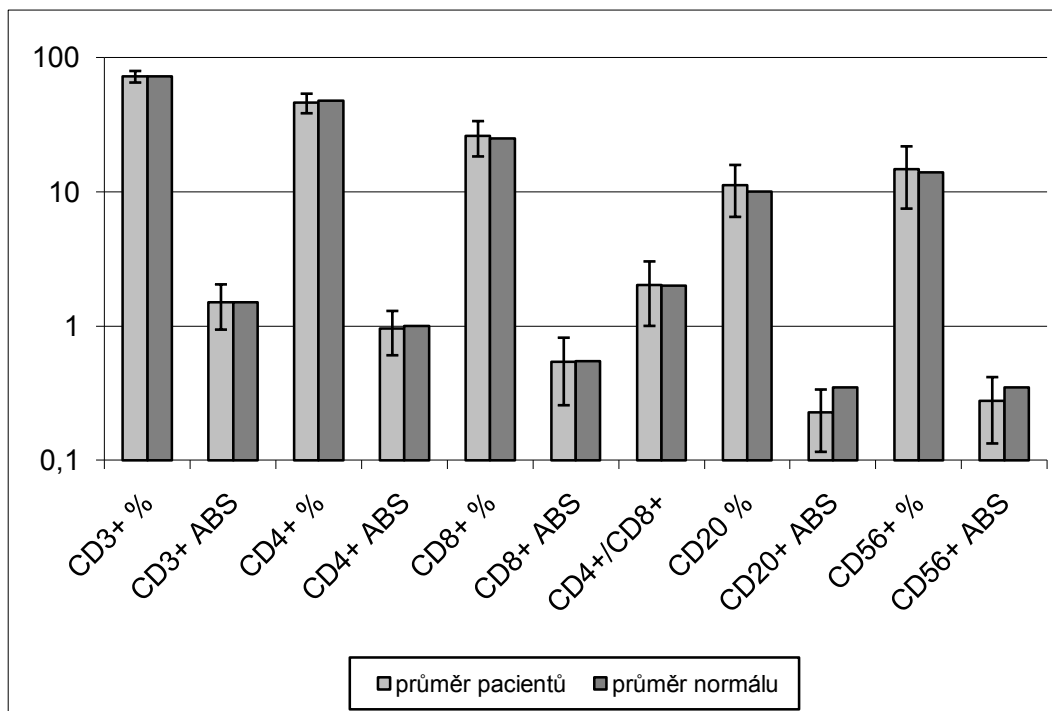
Všechny statistické výsledky CD znaků jsou uvedeny v tabulce č. 3 a grafu č. 1. Výsledky parametrů krevního obrazu jsou v tabulce č. 4 a grafu č. 2.

Tabulka č. 3 Statistické vyhodnocení subpopulací lymfocytů

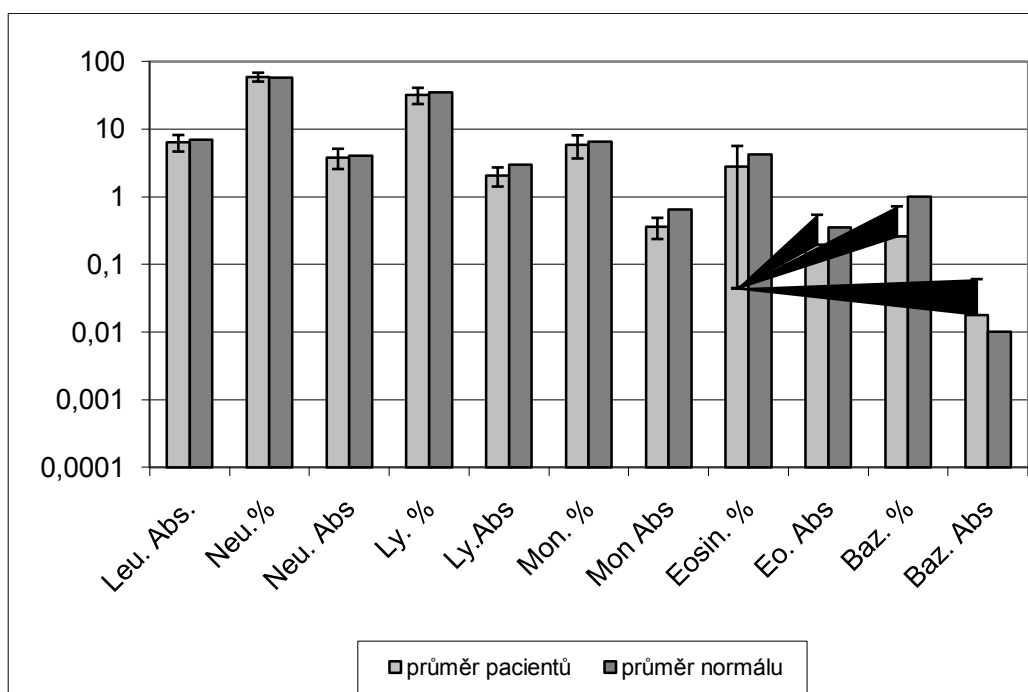
	Průměr pacienti	Průměr normal	Směrodatná odchylka	95% interval spolehlivosti	Statistic. test (T)	Koeficient spoleh. (P)
CD3+ %	72,493	72,5	7,182	70,780 – 74,205	0,008	0,9933
CD3+ ABS	1,497	1,5	0,553	1,365 – 1,629	0,044	0,9651
CD4+ %	46,257	47,5	7,688	44,424 – 48,090	1,353	0,1806
CD4+ ABS	0,954	1	0,346	0,872 – 1,037	1,103	0,2737
CD8+ %	26,059	25	7,665	24,231 – 27,886	1,156	0,2519
CD8+ ABS	0,540	0,55	0,282	0,472 – 0,607	0,309	0,7583
CD4+/CD8+	2,023	2	1,017	1,781 – 2,266	0,19	0,8499
CD20 %	11,209	10	4,686	10,091 – 12,326	2,158	0,034
CD20+ ABS	0,227	0,35	0,111	0,201 – 0,254	1,726	0,089
CD56+ %	14,69	14	7,172	12,980 – 16,400	0,805	0,4236
CD56+ ABS	0,276	0,35	0,142	0,243 – 0,310	1,552	0,1252

Tabulka č.4 Statistické vyhodnocení parametrů krevního obrazu

	Průměr pacienti	Průměr normal	Směrod. odchylka	95% interval spolehlivosti	Statistic. test (T)	Koeficient spoleh. (P)
Leu. Abs.	6,354	6,9	1,744	5,938–6,77	2,619	0,0108
Neu.%	58,716	57,5	8,792	56,619–60,812	1,157	0,2513
Neu. Abs	3,808	4,05	1,264	3,207–4,109	1,602	0,1138
Ly. %	31,81	35	8,548	29,772–33,848	3,122	0,0026
Ly.Abs	2,045	3	0,643	1,891–2,198	12,428	<0,0001
Mon. %	5,83	6,5	2,185	5,309–6,351	2,566	0,0125
Mon Abs	0,359	0,65	0,124	0,329–0,388	19,716	<0,0001
Eosin. %	2,813	4,25	2,769	2,153–3,473	4,343	<0,0001
Eo. Abs	0,195	0,35	0,341	0,1139–0,277	3,798	0,0003
Baz. %	0,257	1	0,457	0,148–0,366	13,595	<0,0001
Baz. Abs	0,018	0,01	0,042	0,008–0,028	1,661	0,1012



Graf č.1 Porovnání průměrů hodnot CD znaků jednotlivých subpopulací lymfocytů pacientů (\pm směrodatná odchylka) s průměrem referenčních hodnot.



Graf č.2 Porovnání průměrů naměřených hodnot leukocytů a subpopulací leukocytů pacientů (\pm směrodatná odchylka) s průměrem referenčních hodnot.

5. DISKUSE A ZÁVĚR

Ze statistického vyhodnocení vyplývá, že v případě naměřených CD znaků jednotlivých subpopulací lymfocytů je statisticky významně vyšší oproti normálním hodnotám pouze relativní počet CD20+ lymfocytů ($p = 0,034$). Ostatní subpopulace lymfocytů nevykazují vůči průměrným normálním hodnotám zdravé populace žádný statisticky významný rozdíl.

Počet leukocytů je statisticky významně nižší ($p = 0,0108$) než průměrná hodnota zdravé populace. Počet jednotlivých typů leukocytů se statisticky od normálních hodnot neliší pouze v případě neutrofilů. Absolutní i relativní počty lymfocytů a monocytů jsou statisticky významně nižší (lymfocyty abs.: $p < 0,0001$, lymfocyty %: $p = 0,0026$; monocyty abs.: $p < 0,0001$, monocyty %: $p = 0,0125$).

Počty eozinofilů a bazofilů vykazují také významně statisticky nižší hodnoty než je průměr normální populace. Toto vyhodnocení však může být zatíženo vyšší chybou, protože počet eozinofilů a bazofilů je v obvodové krvi velmi nízký.

Pro tuto studii jsem zvolila právě virové onemocnění, protože jsem chtěla ověřit, zda nedojde ke zvýšení počtu leukocytů a lymfocytů v krevním odrazu a diferenciálním počtu leukocytů a ke zmnožení populace CD8+, případně poměru CD4+/CD8+ nebo CD56+ buněk jako reakce na viry. Tato hypotéza se nepotvrdila, protože v případě CD8+ a CD56+ nedošlo ke statisticky významným změnám a počty leukocytů a lymfocytů se v krevním obraze, proti očekávání, statisticky významně snížily.

Ze studie nevyplývají jednoznačné závěry ohledně zastoupení jednotlivých subpopulací lymfocytů provázející infekci Herpes virem typu 1 a 2, nápadný je pouze mírný vzestup relativního počtu CD20+ buněk, dále mírný pokles počtu leukocytů, lymfocytů a monocytů v krevním obraze. Příčinou tohoto jevu je nepochybně vliv infekce na imunitní systém. Objasnění bližšího mechanismu by si vyžádalo další podrobnější výzkum.

6. Seznam zkratek

ABS	absolutní počty
Ag	antigen
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
APC	antigen presenting cell
Apo/Fas	apoptotic receptor complex
Apo/Fas L	apoptotic receptor komplex ligand
CD	cluster of differentiation
CMV	cytomegalovirus
CNS	centrální nervová soustava
DAF	decay accelerating factor
DC	dendritic cells
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	deoxyribonucleic acid
EB	Epstein- Baar
EBV	Epstein- Baar virus
FITC	fluorescein izothiokyanát
gG	glykoprotein G
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HHV	herpes hominis virus
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigens
ICAM	intercellular adhesion molecule
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
IM	infekční mononukleóza
INF γ	interferon gama
KIR	killer cell Ig-like receptor
KS	Kaposiho sarkom
LAK	lymphokine activated killer

MAC	membrane attack complex
MHC	major histocompatibility complex
NK	natural killer
PE	phycoerythrin
PC7	phycoerythrin cyanin 7
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonucleic acid
TAP	transporter-associated with antigen processing
TcR	T cells receptor
TH	T lymfocyty helpery
TR	T lymfo regulátory
VZV	varicella zoster virus

7. Literatura

1. **Lyer J.**, Virová onemocnění a problematika jejich léčby. Zdravotní portál, dostupné na https://www.zdravotniportal.cz/clanek.php?id_clanek=32. Datum stažení citace 22. 4. 2010.

2. **Nouza M.** Nejrozšířenějším lidským virem ve světě je CMV, Zdravotnické noviny - ISSN 1214-7664, dostupné na <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/nejrozsirenejsim-lidskym-virem-ve-svete-je-cmv-128484>. Datum stažení citace 22. 4. 2010.

3. **Roubalová, K., Suchánková A.** Kongenitální a perinatální infekce způsobené herpetickými viry. Moderní gynekologie a porodnictví. 9/2000 č. 3. Dostupné na [www: http://www.sfm.gynpor.cz/roubalova.htm](http://www.sfm.gynpor.cz/roubalova.htm). Datum stažení citace 24. 4. 2010

4. **Petráš. M.** Herpes simplex. Epidemiologie. dostupné na [www: http://www.lupidon.info/Epidemiologie.htm](http://www.lupidon.info/Epidemiologie.htm). Datum stažení citace 5. 5. 2010

5. **Krejsek J., Kopecný O., Jankovičová K.** Specifická buněčná imunita. Alergie. 3/2009, 4/2009, dostupné na <http://www.tigis.cz/alergie/ALERG401/06.htm>. Datum stažení citace 5. 5. 2010.

6. **Schmiedbergerová. R.** Eczema atopiím. Pediatri pro praxi 4 / 2005, dostupné na http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=766. Datum stažení citace 5. 5. 2010.

7. **Stříž I., Šedivá D.** Dendritické buňky a jejich úloha v imunitních reakcích, Alergie, dostupné na <http://www.tigis.cz/alergie/alergie202/sediva.htm>. Datum stažení citace 8. 5. 2010.

8. **Penningrová L.,** Imunomodulační terapie v praxi. Practicus-2008-09/19 dostupné na <http://web.practicus.eu/sites/cz/Documents/Practicus-2008-09/19-imunomodulacni-terapie-v-praxi.pdf>. Datum stažení citace 8. 5. 2010.

9. **Krejsek J, Kodydková K., Kopecký O.**, Imunobiologie nádorového bujení, *Alergie* 3/2000, dostupné na <http://www.tigis.cz/alergie/ALERG300/05krejse.htm>. Datum stažení citace 9. 5. 2010.

10. **Litvik R.** Herpetické kožní infekce a jejich léčba, *Med. Pro Praxi* 2008; 5(4): 170–175, dostupné na <http://www.solen.cz/pdfs/med/2008/04/08.pdf>. Datum stažení citace 9. 5. 2010.

11. **Holub M., Aster V., Roubalová K., Záhumenský J., Radina J.** Doporučený postup pro diagnostiku a terapii genitálního herpesu u žen, *Infekce*, dostupné na <http://www.infekce.cz/DoporHSV09.htm>. Datum stažení citace 8. 5. 2010.

12. **Holub M, Labská K, Roubalová K.** Recidivující genitální herpes. *Klin mikrobiol inf lék* 2008;14(2):52-58, dostupné na <http://knil.trios.cz/knil08022c.htm>. Datum stažení citace 8. 5. 2010.

13. **Šinkorová Z., Zárybnická L.** Průtoková cytometrie jako analytická selekční metoda *Vojenské zdravotnické listy ROČNÍK LXXVII*, 2008, č. 3. Datum stažení citace 10. 5. 2010.

14. **Immunotech** Analyzátoary buněk a částic. In vitro diagnostika. dostupné na http://www.immunotech.cz/pdf/IVD_3.pdf. Datum stažení citace 11. 5. 2010.

15. **Synek J., Otřísal V.** Predikční validita testu OSP – výsledky analýzy, 15.9.2008, dostupné na www.scio.cz. Datum stažení citace 11. 5. 2010.