

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci králové**  
Katedra biologických a lékařských věd

**Chlamydie - staronový diagnostický a léčebný problém v humánní medicíně**

Chlamydia – the old-new diagnostic and therapeutic problem in human medicine  
(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Odborný školitel: RNDr. Jiří Koblíha

Práce byla provedena za spolupráce s pracovníky v Centrální laboratoři SZZ Krnov.

Hradec Králové, 2011

Lenka Šifaldová

## *Poděkování*

RNDr. Jiřímu Koblihovi, Státní zdravotní ústav Ostrava, pobočka Bruntál

PharmDr. Petru Jílkovi, CSc., vedoucímu Katedry biologických a lékařských věd,  
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Za cenné rady a připomínky, za pomoc, za umožnění použití výsledků laboratorních vyšetření a materiálů Centrální laboratoře SZZ Krnov ke zpracování statistických dat a vypracování mé práce. Poděkování patří také mé rodině za její trpělivost.

*Prohlášení*

*Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury a z doložených záznamů o výsledcích vyšetření provedených v Centrální laboratoři Sdruženého zdravotnického zařízení Krnov. Moje bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, uvádím v seznamu použité literatury a řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.*

*V Hradci Králové dne:*

# Obsah

<b>Obsah.....</b>	<b>5</b>
<b>Abstrakt.....</b>	<b>7</b>
<b>Summary .....</b>	<b>8</b>
<b>Zadání - cíl mé práce.....</b>	<b>9</b>
1 Úvod.....	10
2 Mikrobiologie.....	11
2.1 Taxonomie .....	11
2.2 Morfologie, vývojový cyklus .....	13
2.2.1 Buněčné typy.....	13
2.2.2 Chlamydiální buňka .....	13
2.3 Vývojový cyklus .....	14
2.4 Antigeny chlamydií.....	15
2.5 Chlamydiální genom .....	16
3 Imunologie, patogeneze a infekčnost .....	17
3.1 Imunitní reakce organismu.....	17
3.1.1 První fáze infekce.....	17
3.1.2 Druhá fáze infekce .....	17
3.2 Patogeneze a infekčnost .....	18
4 Jednotlivé druhy z lékařského hlediska významné pro člověka .....	20
4.1 Chlamydia trachomatis.....	20
4.1.1 Trachom .....	20
4.1.2 Lymfogranuloma venerum .....	20
4.1.3 Urogenitální a oční infekce .....	20
4.2 Chlamydophila pneumoniae.....	21
4.3 Chlamydophila psittaci.....	22
5 Terapie a léčba chlamydiových infekcí .....	23
5.1 Volba léčby .....	23
5.2 Léčba urogenitálních infekcí .....	23
5.2.1 Antibiotická léčba .....	23
5.2.2 Kombinovaná léčba.....	24
5.3 Léčba respiračních infekcí .....	25
5.4 Léčba systémové infekce .....	26
6 Laboratorní diagnostika chlamydiových infekcí .....	27
6.1 Přímý průkaz .....	27
6.1.1 Typy odběrů biologického materiálu .....	27
6.1.2 Přehled metod.....	27
6.1.2.1 Kultivační průkaz .....	27
6.1.2.2 Přímá mikroimunofluorescence (MIF).....	28
6.1.2.3 Detekce antigenu .....	28
6.1.2.4 Detekce úseku NK.....	29
6.2 Nepřímý průkaz.....	31
6.2.1 Typy odběrů biologického materiálu .....	31
6.2.2 Přehled nejpoužívanějších metod.....	31
6.2.2.1 ELISA.....	31
6.2.2.2 Westernblotting .....	32
6.3 Interpretace výsledků - třídy protilátek .....	32
7 Souhrn získaných dat a jejich zpracování.....	35

7.1	Metody používané v praxi.....	35
7.1.1	Přímý imunofluorescenční test (IFA).....	35
7.1.2	Nepřímé stanovení hodnoty titru protilátek (ELISA).....	37
7.1.3	Nepřímé stanovení přítomnosti protilátek ( Westernblott).....	37
7.2	Souhrn a zpracování získaných dat .....	39
7.2.1	Selekce pacientů podle pohlaví a použitých metod.....	39
7.2.2	Selekce pacientů podle pohlaví a různých věkových kategorií – ELISA, WB .....	40
7.2.3	Selekce pacientů podle pohlaví a různých věkových kategorií - IFA .....	41
7.3	Příklady pozitivních nálezů.....	43
7.3.1	Příklad pozitivního nálezu protilátek proti chlamydiím metodami ELISA a WB u vybraných pacientů .....	43
7.3.2	Příklady výsledků imunofluorescenčního testu (IFA) k přímému průkazu antigenu Chl.tr. v urogenitálních vzorcích u vybraných pacientů.....	46
8	Diskuze.....	48
9	Závěr .....	51
10	Seznam použité literatury.....	52
11	Seznam zkratk .....	56

## Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na problematiku diagnostiky a léčby infekcí způsobených bakteriemi rodů *Chlamydia* a *Chlamydophila*, které jsou důležité v humánní medicíně. Jedná se o druh *Chlamydia trachomatis*., která je jedním z původců sexuálně přenosných chorob a *Chlamydophila pneumoniae*, která způsobuje těžké pneumonie.

V teoretické části jsou shrnuty dosavadní poznatky o morfologii, biologii a antigenní výbavě jednotlivých druhů. Zvláštní pozornost je věnována jejich životnímu cyklu, patogenicitě a reakci imunitního systému na tyto infekce.

Infekce, které tyto bakterie způsobují mají rozličné klinické projevy, jsou špatně rozpoznatelné, často překryté jinými chorobami. Orientace lékařů v této problematice i jejich laboratorní diagnostika je stále omezená. Proto mívají komplikovaný průběh, často přecházejí do chronicity a mohou vést k závažným následkům jako je např. neplodnost žen. Cílem této práce je i popis nejčastějších infekcí a možnosti jejich léčby.

V praktické části jsou popsány dosavadní metody laboratorního průkazu chlamydiálních infekcí. Zároveň jsou zde uvedena a zhodnocena data pacientů vyšetřených v Centrální laboratoři SZZ Krnov za období 2.1.2008 do 24.2.2010 na tyto typy infekcí.

## Summary

The bachelor work is focused on diagnosis and treatment infections, which are caused by *Chlamydia bacteria* and *Chlamydophila bacteria* important in human medicine. It is *Chlamydia trachomatis* a common caused of sexually transmited infections and *Chlamydophila pneumoniae* beggetter of pneumonia.

In the theoretical part of the work present morfology, biology findings and antigen set of different types of chlamydia bacteria are summarized. It is payed attention to life cycle, pathogenicity and immunity system reaction. It is hard to recognize these infections because of different clinical manifestations and covering them in other diseases. Physician awareness in this problem and laboratory diagnosis is still limited. Therefor, the course of the disease is complicated, it can usually contribute to the chronicity and cause to serious impact as woman infertility. The aim of this work is also description and treatment options of most common infections.

In the practical part of this work existing laboratory methods are described. Patient resultes of chlamydia infections, which were done in Central Laboratory SZZ Krnov during 2.1.2008 – 24.2.2010 , there are also presented.



## Zadání - cíl mé práce

Svou bakalářskou prací chci poukázat na doposud stále opomíjené téma chlamydiových infekcí. Chlamydie jsou považované na celém světě za nejvíce rozšířené původce pohlavně přenosných nemocí s velmi vážnými následky. Jejich provázanost s běžným životem každého z nás je v určitých obdobích našeho života velmi zásadní. V rámci diferenciální diagnostiky urogenitálních infekcí se právě na chlamydiové infekce příliš nepomýšlí. Proto ve své práci zpracovávám soubor pacientů vyšetřovaných v Centrální laboratoři v nemocnici v Krnově na průkaz chlamydiových infekcí.

Práce obsahuje:

- rešerši odborné literatury týkající se chlamydiových infekcí
- přehled laboratorních metod používaných k diagnostice chlamydiových infekcí
- rozbor výsledků laboratorních vyšetření v souboru pacientů vyšetřovaných danými laboratorními metodami na přítomnost chlamydiových infekcí.

# 1 Úvod

Mikroorganismy nás obklopují všude a stále, ať se nám to líbí nebo ne. Spousta z nich je pro nás prospěšná, ale mnohé nám naopak způsobují spoustu problémů. Sem patří i ty zdravotní. Chlamydie patří na celém světě, především ve vyspělých zemích, k nejčastějším sexuálně přenosným nemocem, které mohou vést k velmi vážným následkům jako je neplodnost (Holmes a spol., 1984). Za její příčinou totiž málokdo hledá chlamydie. V rozvojových zemích jsou zodpovědné za epidemický výskyt oční infekce – trachom vedoucí ke slepotě (Jones, 1975, Věžník, Pospíšil, 1997). Předpokládá se, že i imunopatologické onemocnění ateroskleróza koreluje s infekcí patogenů *Chlamydia pneumoniae* nebo *Helicobacter pylori*. Hovoříme o tzv. infekční teorii aterosklerózy. Zmínku o chlamydiích najdeme i u infarktu myokardu, u astmatu nebo některých karcinomů. Zajímají se o ně i revmatologové (Vojáček, 2004).

Chlamydie jsou gramnegativní (G-) kokoidní bakterie, intracelulárně parazitující v epitelích sliznic, endoteliích, v buňkách hladkých svalů, cév a podle nejnovějších výzkumů i v určitých strukturách tkání centrální nervové soustavy (CNS) (Votava, 2003). Chlamydie nejsou nijak zvlášť odolné bakterie, podléhají většině dezinfekčních prostředků, hynou při teplotě nad 56 °C. *Chlamydia trachomatis* nesnáší vyschnutí, *Chlamydia psittaci* je odolnější, udrží svou infekčnost v zaschlém ptačím trusu i po několik měsíců (Věžník, Pospíšil, 1997).

Zmínky o chorobách, které způsobují tyto bakterie, najdeme již na papyrech z Egypta i v dokumentech pocházejících z Číny (Schachter, 1984). U nás jsme se o ně začali zajímat v šedesátých letech 20. století, především jako o infekce urogenitálního traktu. Na základě pozorování intracelulárních inkluzí se vědci nejprve domnívali, že se jedná o protozoa, později, že se jedná o velké viry a teprve až v roce 1966 byly klasifikovány jako bakterie. Dnešní název je odvozený od původně řeckého slova: chlamys – plášť.

## 2 Mikrobiologie

### 2.1 Taxonomie

Taxonomicky patří chlamydie do řádu *Chlamydiales*, čeledi *Chlamydiaceae* rozdělené podle fylogenetických a genomových analýz na dva rody:

Rod: *Chlamydia* s druhem *Chlamydia trachomatis* (*Chl.tr.*)

Rod: *Chlamydophila* s druhy *Chlamydophila pneumoniae* (*Chl.pn.*), *Chlamydophila psittaci* (*Chl.ps.*) a *Chlamydophila pecorum*.

Je důležité podotknout, že oba rody rozlišují více druhů, ale pro člověka nejsou vnímány jako lékařsky významné (Věžník, Pospíšil, 1997, Medková a spol., 2001, Votava, 2003). První tři druhy jsou patogenní pro člověka i pro zvířata, rod *Chlamydophila pecorum* je důležitý ve veterinární oblasti, protože způsobuje aborty domácích zvířat.

Druh *Chlamydia trachomatis* má 15 sérotypů (imunotypů) (Věžník, Pospíšil, 1997). Nejdůležitější v humánní medicíně jsou druhy *Chl.tr.* a *Chl.pn.* a mezi těmito druhy existuje určitá podobnost, ale i jisté rozdíly, což mám zpracováno v následující tabulce.

Tabulka 1: Diference a charakteristika biologických vlastností druhů *Chl.tr.* a *Chl.pn.*  
(z dat: Věžník, Pospíšil, 1997)

<b>Charakteristika příslušného druhu patogenního přímo pro člověka</b>	<b><i>Chlamydia trachomatis</i></b>	<b><i>Chlamydophila pneumoniae</i></b>
Vzhled elementárních tělísek	oválná	párovitá
Inkluze	rigidní, oválná, vakuolární	oválná, s výraznou denzitou
Glykogen v inkluzích	+	0
Citlivost na sulfadiazin	+	0
Listová biosyntéza	+	0
Jiné diference		odlišná DNA a odlišná séroaktivita
Vývojový cyklus (elem. těl., retik. těl.)	+	+
Rodově specifický antigen – LPS	+	+
Extrachromozomální DNA v plasmidu	+	-
Virulence pro myš	+ až +++	+/-
Růst na kuřecím embryu	++	+
Růst na tkáňových kulturách potencionovaný:		
Centrifugací	+++	+++
Cykloheximidem	++	++
DEAE – dextranem	+++	+

## 2.2 Morfologie, vývojový cyklus

Bakterie rodu *Chlamydia* a *Chlamydophila* patří mezi obligátní intracelulární parazity eukaryotických buněk. Samy nejsou schopné syntetizovat ATP, nemají patřičné enzymatické systémy, a proto jsou závislé na energii hostitelské buňky. Jsou označovány jako nitrobuněční energetičtí parazité. Mají zvláštní složení buněčné stěny. Strukturou je sice podobná G- bakteriím, ale neobsahuje peptidoglykan a obsahuje větší množství lipidů. Množí se unikátním vývojovým cyklem, kdy se bakteriální buňka morfologicky mění (Medková a spol., 2001, Votava, 2003).

### 2.2.1 Buněčné typy

Tvar a velikost, obsah DNA a RNA chlamydiální buňky závisí na aktuálním stádiu vývoje. Chlamydiální buňka zahrnuje dva buněčné typy. První typ: elementární tělíčko je infekční, extracelulární, metabolicky inertní, velikosti 250 - 350 nm, přizpůsobeno k přežití v zevních podmínkách. Elementární tělíška inhibují fagolysosomovou fúzi, jsou toxické pro myši a makrofágy. V elementárním tělísku je centrálně nahuštěna DNA, v retikulárním je více RNA. Druhý typ: retikulární tělíčko, není infekční, je intracelulární, metabolicky aktivní, má difúzně rozptýlenou DNA, osmoticky fragilnější, velikosti 800 - 1000 nm. Retikulární tělíčko transportuje ATP a syntetizuje proteiny. Oba typy mají gen rezistence na antibiotika (Medková a spol., 2001).

### 2.2.2 Chlamydiální buňka

Chlamydiální buňka se skládá z 35 % proteinů a 40 – 50 % lipidů. Byly v nich identifikovány i kryptické plazmidy, které patrně hrají úlohu při přenosu genu rezistence na antibiotika (Grayston, 1989). Oba typy mají bakteriální stěnu jako G- bakterie, ale neobsahují peptidoglykan (Grayston, 1989). Stěna je složena ze dvou trilaminárních membrán, zevní membrány a vnitřní cytoplasmatické, zaručují integritu buněčné struktury. Zevní membrána obsahuje speciální vnější membránový protein (MOMP) (Major Outer Membrane Protein), ten tvoří 30 % celé hmotnosti váhy buňky a zároveň tvoří 60 % buněčné stěny, je bohatý na cystein s disulfidickými vazbami, které se redukují při přeměně elementárního tělíška v retikulární tělíčko (Věžník, Pospíšil, 1997). Elementární tělíčko má na povrchu vyčnívající rosety s výběžky. *Chlamydia trachomatis*

*biovar trachomatis* infikuje hlavně buňky skvamózní - cylindrické, *biovar LGV* infikuje více typů buněk včetně makrofágů (Věžník, Pospíšil, 1997).

### 2.3 Vývojový cyklus

Celý životní cyklus chlamydií začíná uvolněním infekčního elementárního tělíska mimo hostitelskou buňku a napadením nové buňky. Má několik důležitých bodů: přiblížení a adhezi k hostitelské buňce, endocytózu, membranózní změny, efekt infekce na hostitelskou buňku, perzistenci infekce a chlamydiální vývoj na úrovni molekulární biologie (Věžník, Pospíšil, 1997). Prozatím nebyly prokázány žádné chlamydiální adhesiny a jim odpovídající buněčné receptory na hostitelské buňce. Chlamydie nemají vazebnou afinitu, která je třeba patrná u malých virů (Moorman a spol., 1986). Mohou se k hostitelské buňce přiblížit nejrůznějšími mechanismy. Vypadá to, že chlamydie vysílají signály k povrchu hostitelské buňky, které stimulují endocytózu. Aby byl usnadněn přístup živin do chlamydiální buňky, musí být její inkluzní a endozomální membrány modifikovány.

Účinky chlamydií na hostitelské buňky: cytolýza, redukce schopnosti dělení infikované buňky, zvýšení rigidity membrány hostitelské buňky po inkorporaci chlamydiového lipopolysacharidu (LPS). Tento proces je důležitý pro výživu a tím existenci chlamydií. (Věžník, Pospíšil, 1997).

Infekci hostitelské buňky způsobuje elementární tělísko. Průnik částice do buňky zprostředkovává receptor na hostitelské buňce a mechanismus je podobný endocytóze. Elementární tělísko má stabilní strukturu, speciálně adaptovanou k přežití za nepříznivých podmínek při transportu mezi buňkami a je jediné infekční stadium. Elementární tělísko zůstává ve fagosomu po celou dobu rozmnožovacího cyklu. Pozorujeme unikátní jev, kdy je blokována fagolyzomální fúze, po 6-8 hodinách se elementární tělísko transformuje do metabolicky aktivního retikulárního tělíska. Díky této speciální inhibici fagolyzomální fúze jsou endozomálně lokalizované bakterie chráněny před mikrobicidním účinkem intracelulárního prostředí. Zanikají disulfidické vazby v membránovém proteinu MOMP chlamydiové buňky. Membrána buňky je nestabilní, vytvoří se v ní póry, kterými dochází k příjmu ATP a živin z hostitelské buňky do retikulárního tělíska. Syntetizuje se RNA, DNA, lipidy a polysacharidy. Základním

úkolem retikulárního tělíska je binární dělení v následujících 18 - 24 hodinách, čímž spotřebovává energii hostitelské buňky. Pak tyto retikulární tělíska po 24 - 48 hodinách opět zkondenzují do tělísek elementárních. Z každého retikulárního tělíska vznikají tisíce elementárních tělísek. Délka růstového cyklu tak kolísá v rozmezí 48-72 hodin. Fagosomy s retikulárními tělísky představují inkluze uvnitř buněk, které jsou dobře detekovatelné po histologickém barvení Lugolovým roztokem.

Při mikroskopování pozorujeme tzv. intermediální - inkluzní tělíska. V důsledku opakované reprodukce bakterií se tyto útvary stále v průběhu cyklu zvětšují. Na konci vývojového cyklu má hostitelská buňka plnou cytoplazmu elementárních tělísek. Dojde k ruptuře buněčné stěny a cytoplazmatické membrány napadené buňky, ta praská a elementární tělíska se uvolní do okolí a infikují další vnímavé buňky. Někdy jsou tělíska vypuzována i exocytózou, především u buněk infikovaných permanentně (Věžník, Pospíšil, 1997).

## 2.4 Antigeny chlamydií

Na povrchu chlamydiální buňky se vyskytuje celá řada struktur, které považujeme za antigenní. Náš imunitní systém je následně rozeznává a vytváří proti nim obrannou reakci. Chlamydie vykazují výrazné imunogenní vlastnosti. Mají rizikovou speciální antigenní strukturu. Nejdůležitější antigeny dělíme na:

- a) **Rodově specifické** - Vyskytují se na zevní membráně všech chlamydií. Jedná se o lipopolysacharid (LPS), který se skládá z termostabilního uhlovodanu (jeho serologicky aktivní část) a z lipidu A (Věžník, Pospíšil, 1997). A pak se jedná o proteiny tepelného šoku Hsp 60 (Heat Shock Proteins).
- b) **Druhově specifické** - Rozdělují se svou senzitivitou k teplu. Jedná se o membránový protein MOMP, který je sérově specifický, vykazuje silnou protilátkovou odpověď. Jiným typem antigenu je membránový protein vázající penicilíny (PBP) (Penicilin Binding Protein), který je také součástí buněčné stěny (Věžník, Pospíšil, 1997, Medková a spol., 2001). Patří sem např. antigen MOMP pro detekci *Chl.tr.*, *Chl.pn.* a *Chl.ps.*, antigen vnější membránový protein OMP 2 (Outer Membrane Protein) pro detekci *Chl.tr.* a *Chl.pn.*, antigen Hsp 60 a MIP pro detekci *Chl.tr.*, antigeny OMP 4 a OMP 5 pro detekci *Chl.pn.*

- c) **Typově specifické** - Jsou přítomné v elementárních i retikulárních tělískách. (Medková a spol. 2001, Věžník, Pospíšil, 1997).

## 2.5 Chlamydiální genom

U 98 % chlamydií je uložen v jádře, v chromozomu, jako cirkulární dvouvláknová DNA. Asi u 70 % chlamydií je DNA uložena i extrachromozomálně v podobě kryptického plazmidu. Může být užitečný jako vektor transformace chlamydií. Přítomnost a identifikace plazmidu nám potom pomáhá lépe odhadnout rozdíly v infekci, chorobě, nemoci a patogenezí (Stephens, 1990, Věžník, Pospíšil, 1997). Identifikace plazmidu a amplifikace sekvence jeho DNA je důležitá při detekci chlamydií molekulárně biologickými metodami. Např. v diagnostice metodou PCR, kdy detekujeme části druhově specifické nukleotidové sekvence plazmidové DNA (Věžník, Pospíšil, 1997, Medková a spol., 2001).



## **3 Imunologie, patogeneze a infekčnost**

### **3.1 Imunitní reakce organismu**

Chlamydie mohou velmi dobře modifikovat normální imunitní odezvu na infekci - a to jak imunitu specifickou, tak imunitu nespecifickou. Tuto schopnost mají především díky své jedinečné formě nitrobuněčnému parazitismu. Napadají buňky monocytomakrofágového systému a tím ovlivňují i jiné imunokompetentní buněčné elementy organismu. Výsledek imunitní reakce závisí vždy na infekčních vlastnostech bakterií a na stavu imunitního systému hostitele. Za určitých podmínek může být imunita hostitelského organismu potlačena užíváním některých léků. Chlamydie si vybírají jako hostitele eukaryotické buňky, především monocyty, makrofágy, dendritické buňky, dále buňky slizniční, epitelové, hladkých svalů, fibroblasty a další (Věžník, Pospíšil, 1997, Medková a spol., 2001).

#### **3.1.1 První fáze infekce**

Zde jsou do obrany proti ní zapojeny převážně nespecifické mechanismy humorální (komplement, lektiny) i buněčné imunity (NK buňky, neutrofilové, monocyty a makrofágy). Imunocyty pohlcují elementární tělíška (je-li imunitní systém v pořádku), nebo jsou jimi infikovány (je-li imunitní systém už pozmeněn). Makrofágy předkládají chlamydiální antigen spojený s molekulou HLA II. třídy specifickým lymfocytům typu Th<sub>1</sub> (Medková a spol., 2001). Tyto mechanismy jsou nejdůležitější v boji organismu proti chlamydiální infekci.

#### **3.1.2 Druhá fáze infekce**

Aktivací lymfocytů Th<sub>2</sub> dochází k aktivaci lymfocytů B a ty následně tvoří protilátky. Ty jsou součástí specifické imunity, ale ta má jako obrana proti nitrobuněčné chlamydiální infekci menší význam než imunita nespecifická. Protilátky jsou namířeny proti komplexům membránových proteinů (MOMP) a neutralizují infekční formy bakterií, které se vyskytují extracelulárně. Jsou sérotypově specifické, tudíž nefungují proti jinému kmenu. To je důvod, proč se nelze proti chlamydiím očkovat. Klinicky má význam detekce protilátek, ale pomáhá nám jen infekci prokázat a monitorovat průběh nemoci, případně prokázat chronicitu. Při průkazu akutní infekce je detekce protilátek málo spolehlivá a slouží nám spíše ke sledování promořenosti populace (Medková a spol., 2001).

### 3.2 Patogeneze a infekčnost

Chlamydie infikují epitelové, endotelové, svalové buňky, monocyty, makrofágy, lymfocyty, astrocyty, buňky gliové a mikroglie. Brání apoptóze infikovaných buněk, poškozují jejich základní buněčné funkce – především signalizace. Aktivují v hostitelské buňce produkci volných kyslíkových radikálů, růstových faktorů, antigenu Hsp 60, produkci cytosinů a chemokinů – tumor nekrotizující faktor (TNF), interleukiny (IL1, 6, 8, 11, 12), interferon gama (INF $\gamma$ ) ( Polcarová, 2009).

Hostitel (pacient) trpí mnohými zdravotními potížemi. Při vyčerpání tkání, při poruše převodu na synapsích a při hromadění buněčných metabolitů následně dochází k rozvoji onemocnění a patologickým autoimunitním procesům. Patogeneze vychází z přímé destrukce buněk napadených sliznic, které mají receptory pro elementární tělíska.

Chlamydie způsobují různé infekce urogenitálního traktu, očí, chronická onemocnění dýchacích cest, artritidy, vzácně i ornitózu přenesenou od ptáků. Předmětem diskuzí je i jejich podíl na vznik astmatu, sarkoidózy, rakoviny plic, rakoviny děložního čípku, aterosklerózy, mozkové příhodě, akutního infarktu myokardu, roztroušené sklerózy nebo pozdních formách Alzheimerovy choroby ( Medková a spol., 2001, Votava, 2003).

Patogenita vede k rozvoji infekce a chlamydie způsobují 3 základní typy infekcí:

- a) **Akutní infekce** - Projevuje se zánětlivou reakcí v oblasti urogenitálního traktu často pod obrazem jiného infekčního agens. Lékař neustále léčí recidivující, většinou kvasinkové, popř. jiné, i bakteriální, infekce. Chlamydie jsou v pozadí mnohdy skryté za jiné agens.
- b) **Chronická infekce** - V okamžiku, kdy se léčba chlamydiové infekce nedaří, všechny jiné patogeny jsme vyléčili, ale potíže pacienta se stále vracejí, onemocnění přechází do chronicity a imunitní odezva organismu se mění v imunopatologický proces. Nikdy není vyloučen relaps infekce. V prostředí chronického zánětu můžou vzniknout z retikulárních tělísek tělíska aberantní, která při jakémkoli oslabení organismu (běžnou nemocí nebo i stresem) recidivují opět v retikulární a ta pak v elementární tělíska a onemocnění se stává perzistentní.
- c) **Perzistentní infekce** - Znamená vlastně dlouhodobou přítomnost agens v napadených buňkách, která je příčinou reaktivace nebo chronicity onemocnění. Normálně vzniká z jednoho retikulárního tělíska velké množství typických elementárních tělísek, ale při perzistentní infekci, v důsledku limitovaného růstu,

dochází k vytvoření intracelulární dále se nedělící aberantní formy chlamydií. Tato forma má omezenou metabolickou kapacitu. (Medková a spol., 2001). Podstatou perzistence je právě i přítomnost lipopolysacharidu ve stěně té bakterie, protože se umí vyvázat z vazby k receptoru buněk monocytomakrofágového systému a znovu aktivovat jiné imunocyty. Diagnosticky zjistíme negativní kultivaci a změnu ve složení protilátek. Perzistence vzniká působením řady endogenních i exogenních faktorů, při jejich odstranění je reverzibilní, může jít o některé podávané léky, o následek výživového deficitu pro hostitelskou buňku i pro mikroorganismus (Medková a kol., 2001).

## 4 Jednotlivé druhy z lékařského hlediska významné pro člověka

### 4.1 Chlamydia trachomatis

Tento patogen je nejrozšířenější, způsobuje v podstatě 3 typy onemocnění odlišitelných sérotypově. Endemické nákazy (onemocnění: Trachom a Lymfogranuloma venerum) v rozvojových zemích, urogenitální a oční infekce ve vyspělém světě.

#### 4.1.1 Trachom

Je typické onemocnění postihující oko, které vyvolávají sérotypy *Chl.tr. A, B, Ba, C* - způsobují chronickou konjunktivitidu vedoucí až k ložiskovým nekrózám a k jizvám na spojivce oka. Oční víčko se jizvením stočí a při mrkání abraňuje rohovku řasami, takže dochází k jejímu zakalení, neléčené onemocnění nakonec vede ke slepotě (Medková a spol., 2001, Votava, 2003). Trachom je nejčastější příčinou slepoty na světě, protože v postižených tropických a subtropických oblastech je infikováno až 25% obyvatelstva. Způsobují akutní infekce především u dětí, vektorem onemocnění jsou mouchy (Věžník, Pospíšil, 1997, Medková a spol., 2001).

#### 4.1.2 Lymfogranuloma venerum

Je endemické onemocnění lymfatického systému, především v oblasti genitálu, které vyvolávají sérotypy *Chl.tr. L1, L2, La2, L3*. Klasická venerická nákaza postihuje lymfatické uzliny, s tvorbou bolestivých navenek se provalujícími bubonů. Vede k rozsáhlému destruktivnímu zánětu s následným jizvením ve tkáni genitálu a konečníku. Takto postižené bývají častěji ženy, protože u mužů jsou úvodní stádia lépe viditelná a tím pádem lépe léčitelná (Medková a spol., 2001, Votava, 2003)

#### 4.1.3 Urogenitální a oční infekce

- Oční infekce způsobují záněty oční spojivky, posléze chronickou keratokonjunktivitidu, která opět vede až k oslepnutí (Medková a spol., 2001).
- Urogenitální infekce jsou způsobeny sérotypy *Chl.tr. D-K*. Představují více než 50 % všech urogenitálních nákaz, tím se řadí mezi původce pohlavních chorob STD (Sexual Transmitted Disease). Jsou celosvětově nejčastěji sexuálně přenosným patogenem (Medková a spol., 2001). Způsobují postižení urogenitálu, onemocnění probíhá

postupně ve třech stádiích a ústí v rozsáhlý destruktivní zánět tkáně genitálu a konečníku. Dojde k postižení lymfatických uzlin s tvorbou bolestivých bubonů a jizev. Akutní infekce má většinou asymptomatický průběh, je zde vysoké riziko přechodu do chronicity. Onemocnění se klinicky manifestuje až v období těžkého zánětlivého fibroproduktivního procesu (Medková a spol., 2001).

U žen způsobuje cervicitidu, uretritidu, salpingitidu, bartolinitidu, endometritidu a perihepatitidu. Dochází k závažným postižením hlavně vnitřních reprodukčních orgánů a následně k infertilitě. Infekce se dostává přes dělohu až do vejcovodů, kde se vytvoří condylomata a cuminata - což jsou zduřeniny na stěnách vejcovodů. Způsobují jejich neprůchodnost – tedy neplodnost, tím mohou být i jednou z příčin mimoděložního těhotenství a případně chronických bolestí v pánvi (Medková a spol., 2001).

U mužů způsobuje závažné uretritidy, epididymitidy a prostatitidy. Chlamydiová nákaza u STD mívá většinou souvislost ještě s jiným mikroorganismem přenosným pohlavním stykem. Často se jedná o formu tzv. postgonokokového zánětu. *Neisseria gonorrhoeae* jako původce kapavky je mikrobiologicky snadněji identifikován a rychleji vyeliminován antibiotiky, ale klinické obtíže stále přetrvávají v důsledku přítomnosti chlamydiové infekce (Medková a spol., 2001).

Asi 2/3 nález probíhá v úvodní fázi onemocnění bezpříznakově, projeví se klinicky až v důsledku změn způsobených záněty tkání a orgánů. Cervikální chlamydiové infekce jsou považovány za jeden z rizikových faktorů pro vznik karcinomu děložního hrdla ze skvamózních buněk (sérotypově specifické pro sérotyp G). V některých studiích se zmiňuje zvýšené riziko přenosu viru HIV. Samozřejmě je možný přenos infekce *Chlamydie trachomatis* vertikálně z matky na plod, což bývá až v 65 % případů při nálezce matky (Medková a spol., 2001).

## **4.2 Chlamydomphila pneumoniae**

Je respirační patogen, infekce se šíří kapénkami nebo přímým kontaktem s nemocným. Nákaza nebývá vždy klinicky patrná, manifestuje se nejčastěji jako akutní infekce horních cest dýchacích nebo dolních cest dýchacích. Projevuje se jako faryngitida, sinusitida, otitida, astma bronchiale, bronchitida nebo pneumonie. Záněty plic mají stejné nebo

podobné klinické příznaky jako i jiné atypické pneumonie způsobené třeba legionelami nebo mykoplazmaty (Votava, 2003, Medková a spol., 2001).

### **4.3 Chlamydophila psittaci**

Je původcem tzv. papouščí nemoci – psitakózy, samozřejmě napadá i jiné ptáky, způsobuje tzv. ornitózy. Původce se skrývá v peří, exkrementech, krvi i v tkáních infikovaných jedinců. Přenos na člověka je vzácný, ale přesto k němu může dojít. K nákaze dochází nejčastěji vdechnutím prachu kontaminovaného vysušenými ptačími exkrementy, i inhalací v aerosolové formě z moči, sekretů dýchacího traktu. Onemocnění se projevuje vysokou horečkou, zchváceností, bolestí hlavy, svalů a kloubů a suchým dráždivým kašlem. V některých případech se objevují i příznaky postižení centrálního nervového systému (CNS), systémových chorob (hepatomegalie, splenomegalie). Jsou diagnostikovány nejčastěji sérologicky (Medková a spol., 2001, Votava, 2003).

## 5 Terapie a léčba chlamydiových infekcí

### 5.1 Volba léčby

Úspěšnost léčby spočívá v dobře zvoleném antibiotiku. Důležité je, aby měl podávaný preparát požadované farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti. Potřebujeme, aby pronikal v dostatečné koncentraci k množícím se chlamydiím, aby měl vysokou tkáňovou koncentraci v místě infekce, to znamená především ve fagolyzozomu infikovaných buněk. Měl by mít maximální mikrobiální účinek při minimální inhibiční koncentraci a stabilitu v kyselém prostředí nitrobuněčných myeloperoxidáz.

Dalším požadavkem je co nejdelší eliminační poločas, aby podávání léku postihlo co největší fázi životního cyklu chlamydií. Samozřejmě potřebujeme u preparátu minimum vedlejších účinků a interakcí s jinými léky. Preparát by měl být účinný i na další přidružené bakteriální patogeny a kompatibilní případně s jinými antibiotiky. Měl by mít současně i imunomodulační efekt (Medková a spol., 2001, Toršová, 2009).

Při výběru antibiotik má několik možností, záleží na tom, o jaký typ infekce se jedná, který druh infekci způsobuje a v jakém stádiu onemocnění se právě pacient nachází. Existují různá doporučení na léčbu chlamydiových infekcí, je nutné ji vhodně zvolit s ohledem vždy na konkrétní případ. Jednotné schéma vhodné pro léčbu chlamydiových infekcí však zatím neexistuje. Pokusím se popsat léčbu u jednotlivých typů infekcí.

### 5.2 Léčba urogenitálních infekcí

Urogenitální infekce způsobují kromě chlamydií: *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *Enterobacteriaceae sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* ( Medková a spol., 2001, Horváth, 2009).

#### 5.2.1 Antibiotická léčba

Primárně se infekce léčí antibiotiky. Z velké části dané požadavky splňují makrolidy, tetracykliny a systémové fluorové chinolony II. a III. generace. Makrolidové antibiotika blokují proteosyntézu na ribozomech chlamydií, zlepšují fagocytózu, s makrofágy se dostávají rychleji do místa infekce, aktivují je a podporují v nich tvorbu cytosinů, dosahují vysoké tkáňové koncentrace, působí mírně imunostimulačně.

Nejvhodnější je azitromycin. Má až 10x vyšší tkáňovou koncentraci v endozomu než jiná antibiotika a hlavně má dlouhý eliminační poločas, který odpovídá přibližně celému vývojovému cyklu chlamydií, což je asi 60 – 70 hodin.

Tetracyklinové antibiotika zabraňují přístupu aminokyselin na ribozom, účinkují na 30s podjednotku ribozomu, působí spíše imunosupresivně. S ohledem na potenciální teratogenicitu se tetracykliny nesmí podávat v graviditě a jejich podávání je omezené i v období dospívání od 12 do 18 let.

Fluorové chinolony II. a III. generace. Jejich účinek je dán blokováním topoizomerázy - DNA gyrázy. Mají velmi nízké minimální inhibiční koncentrace (MIC). Pronikají aktivním transportem velmi rychle a jsou stabilní v kyselém prostředí myeloperoxidáz. Bohužel mají nejzávažnější nežádoucí účinky ze strany nervového systému (nespavost, únava, podrážděnost a ale i epilepsie nebo psychóza) mají problém i s hepatotoxicitou, působí mírně imunostimulačně. S ohledem na potenciální teratogenicitu, se chinolony nesmí podávat v graviditě a jejich podávání je omezené i v období dospívání od 12 do 18 let. (Toršová, 2009, Medková a spol., 2001).

Vždy je potřeba velmi pozorně číst příbalové letáky každého léku, kde jsou uváděny příslušné informace velmi podrobně. Antibiotika většinou interagují v kombinaci s jinými léky, jako jsou např. warfarin, teofylin, dioxin i kofein (Medková a spol., 2001).

Délka podávání antibiotik bývá různá, u žen bývá 7 dní, u mužů 10 dní. Komplikace způsobují infekce staršího data a infekce jinými patogeny. Velmi důležitá a nevyhnutelná je samozřejmě léčba partnera, popř. samozřejmě všech předchozích partnerů nebo sexuálních kontaktů (Medková a spol., 2001).

### **5.2.2 Kombinovaná léčba**

V posledních letech se preferuje tzv. kombinovaná léčba, kdy se doporučuje kombinace minimálně 2 antibiotik současně s dalšími přípravky neantibiotické povahy jako jsou proteolytické enzymy (např. wobenzym nebo chymotrypsin) a probiotika. Velmi dobrá efektivita léčby urogenitálních chlamydióz je popisována při současném podávání antibiotik a proteolytických enzymů, dochází ke zlepšení penetrace antibiotik do infikovaných tkání – tzv. efekt vehikula (Toršová, 2009). Důležitý je i imunomodulační



efekt enzymové terapie. Dochází ke stimulaci fagocytární a cytotoxické aktivity některých buněk imunitního systému a optimalizaci produkce některých cytokinů (Honzíková, 2009).

Zároveň je velmi vhodné používat jako doplňkovou léčbu i již zmíněná probiotika. Probiotika jsou schopné stimulovat vrozenou i získanou imunitu, aktivují fagocytózu a zvyšují imunitu sliznic. Podáváním antibiotik se sice zničí většina patogenů, ale naruší rovnováha v původní poševní mikroflóře. Antibiotika už neobnovují bohužel původní mikroflóru, ať už střevní nebo poševní, ustálení rovnováhy obnovíme právě podáváním probiotických preparátů (Sládková, 2009).

V současné době je důležitá také rekonvalescenční léčba o pacientky po gynekologických operacích, po prodělané chlamydiální infekci. Ta se odehrává v lázních.

### **5.3 Léčba respiračních infekcí**

Chlamydie způsobují respirační infekce horních a dolních cest dýchacích spolu s jinými patogeny. Např.: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma hominid* (Medková a spol., 2001).

Diagnostika respiračních infekcí je velmi problematická. V období akutní infekce je vlastně nemožná, protože se protilátky ještě nevytvořily. Protilátky můžeme stanovit až po dvou týdnech od začátku infekce. Stanovujeme protilátky ve třídě IgM, IgA a po prodělané infekci i IgG. Diagnostika pomocí PCR se u *Chl. pn.* provádí jen výjimečně na vybraných pracovištích. Klinika onemocnění je vždy stejná jako u jiných respiračních infekcí (Ševčík a kol., 2004, Medková a spol., 2001).

Tím, že je infekce přidružená většinou ještě k nějakému jinému patogenu, tak se volí antibiotikum s ohledem na ten druhý patogen. Např. otitidu u dětí způsobují většinou mykoplasmy, všechna orálně podávaná antibiotika vykazují nízkou tkáňovou koncentraci ve středním uchu, nejúčinnější bývá azitromycin. U dospělých způsobuje otitidu většinou nějaký jiný patogen spolu s chlamydií. Potřebujeme-li antibiotikové pokrytí na anaerobní bakterie – preferujeme klindamycin nebo přidáváme aminopeniciliny inhibující

betalaktámy. Na G-enterobakterie účinkují fluorové chinolony, na pseudomonády účinkuje ciprofloxacin (Medková a spol., 2001).

Sinusitida a bronchitida mívají společnou etiologii. Částečně jsou vyvolány chlamydiemi, částečně anaeroby. Podáváme makrolidy, aminopenicilin, event. klindamycin. U vracející se infekce je nutné vyšetřit IgM, PCR. U léčby makrolidy je prokázán např. ochranný účinek na řasinky respiračního epitele a také stimulace imunitního systému – makrofágy (Medková a spol., 2001).

#### **5.4 Léčba systémové infekce**

Nejčastějším systémovým onemocněním, na kterém se podílejí i chlamydie, je artritida. Pokud se prokáže vyšetřením synoviální tekutiny např. metodou PCR přítomnost chlamydií, je lékem první volby samozřejmě azitromicin a doxycyklin. Nelze-li tekutinu odebrat, nasadíme antibiotickou léčbu bez průkazu. Nevidíme-li alespoň částečný léčebný efekt po dvou týdnech podávání léků, jedná se pravděpodobně o parainfekční artritidu a léčba antibiotiky nemá význam (Medková a spol., 2001).

## 6 Laboratorní diagnostika chlamydiových infekcí

Diagnostické metody dělíme na přímé a nepřímé.

### 6.1 Přímý průkaz

Přímý průkaz znamená, že stanovujeme přítomnost antigenu nebo části nukleové kyseliny (NK) daného patogenu. K tomu potřebujeme speciální odběr biologického materiálu.

Základní podmínkou je správně provedený odběr. Dle druhu klinického materiálu zvolíme typ odběrové soupravy. Chlamydie jsou nitrobuněční parazité, proto musíme odběrem získat vždy příslušné infikované buňky (slizniční). Odběr je velmi důležitý především u akutních infekcí, kdy stanovujeme přímo antigen nebo NK. K diagnostice se používají vysoce citlivé a specifické testy (Medková a spol., 2001).

#### 6.1.1 Typy odběrů biologického materiálu

- Výtěr z uretry u mužů - před odběrem je důležité minimálně 2 hodiny nemočit. Odebírá se z hloubky 2 – 4 cm rotačním pohybem odběrového tamponu v močové trubici po dobu 20 s, nejprve před masáží a pak znovu po masáži prostaty.
- Výtěr z exocervixu a endocervixu popř. ještě z uretry u žen - po odstranění exocervikálního hľenu se provede endocervikální výtěr rotačním pohybem odběrového tamponu po dobu 20 s.
- Provádí se i vyšetření z rektálního výtěru, nazofaryngeálního výtěru nebo konjunktiválního stěru.
- Provádí se vyšetření i z moči, kdy se odebírá 15-20 ml první porce ranní moči do sterilní nádoby. (Medková a spol., 2001)

#### 6.1.2 Přehled metod

##### 6.1.2.1 Kultivační průkaz

Jde o mikroskopický průkaz živých mikroorganismů po jejich pomnožení na tkáňových kulturách (McCoy, BMG, Hela buňky a další buněčné linie). Následně se mikroorganismy značí např. barvením fluoresceinem. U kultivačního průkazu *Chl. tr.* je citlivost 60 - 80 %. Jsou zde ale vysoké nároky na transport, vysoké technické nároky (práce s buněčnými kulturami, časové pasážování) a vysoké nároky na zkušenosti hodnotícího (to je vždy subjektivní, takže je zde riziko menší specifity).

Vyšetření se používá pro výzkumné a epidemiologické účely, ne pro rutinní diagnostiku. U kultivačního průkazu *Chl.pn.* se velmi často setkáváme s falešnou pozitivitou. Lepší vypovídající hodnotu má vyšetření z distálních oblastí dýchacího ústrojí, pohrudniční nebo kloubní punktáty, popř. sputum nebo brochoalveolární laváž (BAL) (Věžník, Pospíšil, 1997, Medková a spol., 2001).

#### **6.1.2.2 Přímá mikroimunofluorescence (MIF)**

Odebraný klinický materiál (většinou výtěr nebo stěr) je aplikován a zafixován na mikroskopické podložní sklo. Následně se na preparát nanese monoklonální protilátka značená fluoresceinem proti hledanému antigenu. V případě přítomnosti hledaného antigenu v odebraném vzorku na mikroskopickém preparátu pak fluorescein ve fluorescenčním mikroskopu při světle zeleně září. Zde jsou také vysoké nároky na zkušenosti hodnotícího (Medková a spol., 2001).

#### **6.1.2.3 Detekce antigenu**

V krvi nebo séru prokazujeme prozánětlivé aktivátory makrofágů a lymfocytů. V kapitole 2.4 jsem uvedla, že existují antigenní struktury na povrchu chlamydií, které se dají detekovat a tím prokázat. To jsou antigenní lipopolysacharid LPS (rodově specifický), antigeny tepelného šoku chHsp (především u perzistentních forem) a komplex membránových proteinů MOMP (ty jsou druhově specifické jako součást rigidní buněčné stěny elementárních tělísek) (Horová, 2009).

Tyto antigeny můžeme nejčastěji detekovat metodou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Na pevné fázi (mikrotitrační destička) je nafixována příslušná monoklonální protilátka, která se v reakci naváže na antigen přítomný v biologickém materiálu. Vytvoří se komplex antigen-protilátka, na tento komplex se naváže konjugát, poté substrát a štěpením substrátu vzniká barevný produkt. Ten detekujeme, měříme absorbanci, která je přímo uměrná určité koncentraci antigenu ve vzorku. Výsledek odečítáme z kalibrační křivky.

Prokazuje se zpravidla rodově specifický chlamydiální LPS. V případě positivity je nutné použít nějaký konfirmační test, neboť tyto ELISA metody nejsou schopny určit, o jaký druh patogenu se jedná. (Medková a spol., 2001).

#### **6.1.2.4 Detekce úseku NK**

Průkaz části NK patogenu se detekuje pomocí molekulárně biologických metod (Meisels, Morin 1991, Medková a spol., 2001).

##### **a) Metody bez molekulární amplifikace, s následnou hybridizací.**

Tyto metody jsou založeny na vytvoření stabilních dvouřetězcových komplexů (hybridů), které jsou následně chemiluminiscenčně detekovány. Hybridy se vytvoří ze specifických jednovláknových úseků NK (ze synteticky připravených genových sond) a k nim komplementárních úseků mRNA z agens (ze vzorku). Používají se pro výtěry, výjimečně pro moč.

##### **b) Metody s molekulární amplifikací a následnou hybridizací.**

Detekujeme určitý specifický úsek NK bakterie přítomné v odebraném agens ze vzorku. Tento úsek, vymezený primery, je jednoznačně identifikován a amplifikován (mnohonásobně kopírován geometrickou řadou). Po dosažení určitého množství kopií (amplikonů) může být patogen zachycen příslušným detekčním systémem. Tím může být např. elektroforéza, chemiluminiscence nebo hybridizace s komplementární genovou sondou a následnou vizualizací příslušným enzymem nebo barvivem fluoresceinem. Využívají se především při screeningu asymptomatických osob. Speciálně se využívají při vyšetření chlamydiální kontaminace spermatu odebíraného pro účely umělého oplodnění (Meisels, Morin, 1991, Medková a spol., 2001).

U testů s amplifikací enzymatického signálu je vyšší citlivost, bez amplifikace enzymatického signálu se pohybuje v rozmezí 50-80 % citlivost. Různé molekulárně biologické amplifikační metody jsou různě citlivé v závislosti na různých inhibitech přítomných ve vzorku a přítomných enzymů používaných v reakci. (Meisels, Morin, 1991, Medková a spol., 2001).

#### **Druhy používaných molekulárně biologických metod:**

**PCR** - polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction), **LCR** – ligázová řetězová reakce (Ligase Chain Reaction), **TMA** – transkripční mediovaná amplifikace, **SDA** – Strain Displacement Amplification. U nás je nejrozšířenější používanou molekulárně biologickou metodou PCR, manuální nebo poloautomatizovaný systém se senzitivitou 92-99%. (Meisels Morin, 1991, Medková a spol., 2001).

## PCR - polymerázová řetězová reakce

Toto je u nás nejpoužívanější metoda. Test je vysoce specifický a senzitivní, protože je zde minimální riziko nespecifické positivity. Případná kontaminace amplikonů přítomných v laboratorním prostředí je odstraněna enzymatickou degradací nespecifické negativity. Nespecifická negativita je odstraněna systémem detekce inhibitorů DNA polymerázy. V poslední době se v diagnostice uplatňuje stále více, protože je o 20-30% citlivější než ostatní používané metody (Horváth, 2009).

Testovaným materiálem mohou být výtěry uretrální, endocervikální, případně moč, i krev, i jiné klinické vzorky, stěr ze spojivky, synoviální tekutina, punktát z Douglasova prostoru, materiál z laparoskopie. U těchto je potřeba eliminovat inhibitory DNA polymerázy.

**Princip metody:** jedná se o amplifikaci části mikrobiální DNA ležící mezi dvěma primery (oblastmi o známé sekvenci nukleotidů), které udávají specifitu každé reakce. Cyklicky se opakuje enzymově katalyzovaná syntetická reakce. Používaný enzym bývá termostabilní DNA polymeráza (tzv. Taq polymeráza). Nejvíce se používá k diagnostice Chl.tr. Amplifikuje se úsek asi 207 nukleotidů z DNA plazmidu společného všem sérovarům Chl. Tr.. U průkazu Chl. pn. se spíše používá ve výzkumné činnosti – např. k průkazu v indukovaném sputu nebo BALu u astmatu, v kloubním punktátu u postchlamydiové artritidy (Medková a spol., 2001, Weidner a kol., 2009, Kradin, 2010).

Každá PCR má cyklus rozdělený na tři základní fáze probíhající při odlišných teplotách:

**První fáze** - denaturace stanovené DNA – potřebujeme rozplést mikrobiální dvouvláknovou DNA přítomnou ve vzorku na dvě jednovláknové DNA, bez poškození nukleotidové sekvence.

**Druhá fáze** - dojde k hybridizaci primerů, sníží se teplota a primery se váží na komplementární úseky jednovláknové DNA.

**Třetí fáze** – tímto máme označené určité místo amplifikace konkrétní jednovláknové DNA – máme místo působení DNA polymerázy a syntetizuje se nám nové vlákno podle původní jednovláknové DNA. Tím, že se tento cyklus nesčetněkrát opakuje, narůstá nám tak množství hledané DNA. Získáme produkt o vysoké koncentraci DNA, kterou již jsme

schopni detekovat. Např. navázáním na genovou sondu značenou enzymem k vizualizaci (Medková a spol. 2001, Weidner a kol., 2009, Kradin, 2010). V současné době se nejvíce používá speciální případ tzv. Real-time PCR, což pro nás znamená detekci v reálném čase. Sondu přidáváme na začátku reakce spolu s ostatními složkami v tzv. mastermixu. Tím, že je sonda značená nějakým fluorescenčním barvivem, máme možnost ji sledovat v celém průběhu reakce, v kterémkoli čase (Weidner a kol., 2009, Kradin, 2010, Medková a spol., 2001).

## **6.2 Nepřímý průkaz**

### **6.2.1 Typy odběrů biologického materiálu**

Provádí se vyšetření ze srážlivé krve, případně z likvoru odebraného při lumbální punkci.

Nepřímým průkazem prokazujeme protilátky proti chlamydiálním antigenům v krevním séru pacienta. Dostupné vyšetřovací metody dělíme do 2 základních skupin:

- a) Metody prokazující protilátky proti antigenům rodově společným chlamydiovým LPS a Hsp.
- b) Metody určené k průkazu protilátek proti antigenům konkrétního druhu chlamydií - a to proti proteinům obsažených ve všech chlamydiových membránách elementárních tělísek – MOMP.

### **6.2.2 Přehled nepoužívanějších metod**

#### **6.2.2.1 ELISA**

Prokazujeme většinou tvorbu protilátky, které náš organismus tvoří při imunitní odezvě jako reakci na antigen. Např. protilátky proti antigenu LPS, antigenu Hsp60, proti druhově specifickým antigenům MOMP. Antigen je navázán na mikrotitrační destičce, specifická protilátka, která se na něj naváže, je ve vyšetřovaném séru. Vazbu komplexu antigen-protilátka vizualizujeme enzymatickou reakcí.

Kvantitativní nebo semikvantitativní výsledek je hodnota titru protilátek, nebo stanovená koncentrace příslušných protilátek. ELISA má výhodu v průkazu protilátek v různých imunoglobulinových třídách (IgM, IgA a IgG), protilátky proti LPS se vytvářejí dříve než protilátky proti druhově specifickým proteinům MOMP. Protilátky proti LPS jsou většinou

*Chl.pn.* Používají se diagnostické soupravy s rekombinantním chlamydiálním LPS, aby nedocházelo k nespecifické zkřížené reakci s protilátkami jiných G- bakterií (Horváth, 2009, Polcarová, 2009, Medková a spol., 2001).

U malých dětí do dvou let musíme vždy vyšetřovat protilátky proti jednotlivým chlamydiálním druhům (*Chl.tr.*, *Chl.pn.*, *Chl.ps.*) ve třídách IgM, IgA a IgG. Jejich imunitní systém netvoří dost protilátek, protože ho nemají dostatečně vyzrálý. K detekování protilátek se zpravidla používala mikroimunofluorescence (MIF).

V posledních letech používáme druhově specifické testy ELISA, nejčastěji zachycující protilátky ve třídě IgM a IgA. Chlamydiální LPS společně s Hsp jsou většinou exprimovány v případě chronické a perzistující infekce, tudíž proti nim tvoříme protilátky. Je dobré vyšetření doplnit i o stanovení druhově specifických protilátek, abychom zjistili typ nákazy (Horváth, 2009, Polcarová, 2009, Medková a spol., 2001).

#### **6.2.2.2 Westernblotting**

Touto technikou detekujeme přítomnost protilátek proti chlamydiálním antigenům rodovým i druhovým přeneseným na nitrocelulóзовé membráně. Detekce probíhá po předchozím elektroforetickém rozdělení a aplikaci různé řady antigenů na membránu. Tím se vytvoří matrice. Při vyšetření hodnotíme přítomnost specifických proužků tzv. bandů, na membránových páscích. Typ prokázané protilátky pomáhá potom lékaři při rozlišení, o jaký typ infekce se jedná – aktivní, anamnestickou, případnou reinfekci, latentní, proběhlou, chronickou nebo perzistující. Souběžně s tímto hodnotí i klinický stav nemocného (Medková a spol., 2001, Horváth, 2009, Polcarová, 2009).

### **6.3 Interpretace výsledků - třídy protilátek**

Hodnocení jsem uvedla v tabulce č.2.. U akutní fáze infekce *Chl.tr.* se nedají stanovit serologicky protilátky ve třídě IgM. Protilátky IgM u infekce *Chl.pn.* mají svou interpretační váhu pouze v dětském věku, neboť téměř všichni onemocníme v tomto věku infekcí *Chl.pn.* spolu s nějakým přidruženým patogenem. Odborníci doporučují tyto protilátky stanovovat asi do deseti let věku.

V některých případech můžou přetrvávat IgM v rodových i druhových specifických testech i u dospělých, probíhá-li právě v organismu intenzivní reinfekce. Protilátky ve třídě



IgA se vytvářejí později a prokazují nám aktivní infekci. Protilátky ve třídě IgG jsou považovány za pozitivní průkaz prodělané infekce. Při klinicky suspektní infekci mohou být protilátky IgG vysoké a ukazují na akutní infekci (Medková a spol. 2001, Polcarová 2009). (viz.tabulka č.2)

Tabulka 2: **Hodnocení infekce podle výsledků zjištěné hladiny jednotlivých tříd protilátek** (Polcarová, 2009, Polcarová, 2010)

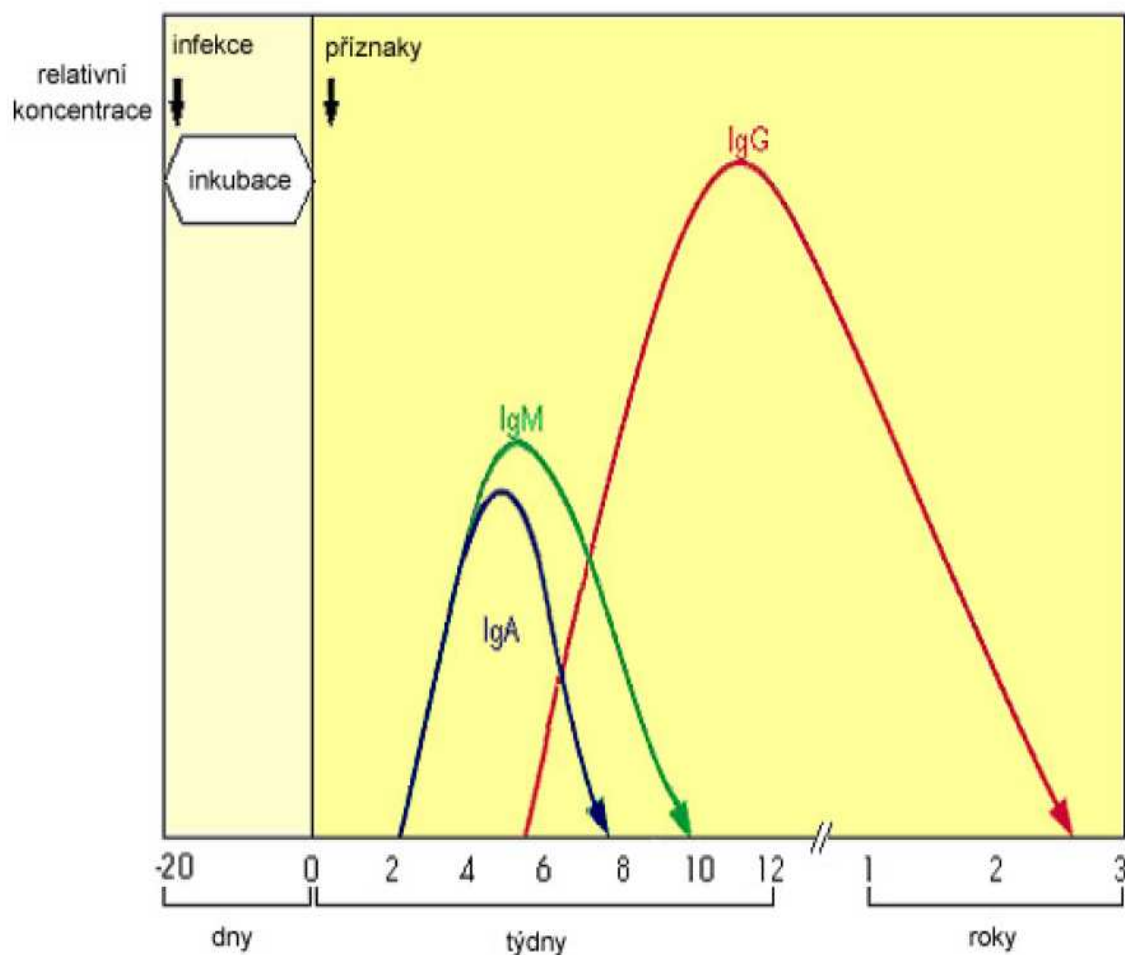
IgM	IgA	IgG	Čas tvorby	Hodnocení hladiny protilátek
-	-	-		Výsledek negativní, ev.falešně negativní, odběr proveden moc brzy
+	-	-	IgM do 2 týdnů	Začínající infekce, léčit, nutný opakovaný odběr po 3 týdnech, eventuálně znovu po 6 týdnech, případně po léčbě
+	+/-	+/-	IgA od 3 týdnů	Primoinfekce, akutní infekce, příp. reinfekce, chronicita
+	+	+	IgG za 6 týdnů	Akutní infekce, reinfekce, chronicita
-	-	+		Perzistující infekce, i chronická, příp. stav po prodělané infekci
-	+	+/-		Proběhlá nebo chronická infekce, důležitá je klinika

Velmi důležitý ukazatel průběhu infekce je dynamika tvorby protilátek. Ideální pro správnou interpretaci serologických výsledků je vhodné vyšetřovat alespoň dva nebo tři odběry za sebou vždy po určité době. První odběr bývá obvykle v úvodu onemocnění, následující po dvou až třech týdnech, pak po čtyřech až šesti týdnech v průběhu rekonvalescence.

Je nezbytné testovat tyto odběry vždy ve stejné laboratoři, protože u jednotlivých používaných diagnostických souprav se kriteria pro hodnocení výsledků mohou lišit podle použitých komponent. Vyšetření protilátek je vždy jen součástí celého komplexního hodnocení k určení diagnózy pacienta, společně s klinickými nálezy, anamnézou a s

případnými výsledky ostatních laboratorních a dalších potřebných vyšetření (Medková a spol., 2001, Polcarová, 2009).

Obr. 1: **Dynamika tvorby protilátek** ( Laboratorní příručka TEST LINE- ELISA Brno, Šedivý, Lukš, 2007, Šifaldová, 2008)



## 7 Souhrn získaných dat a jejich zpracování

Ke zpracování praktické části práce byla využita data poskytnutá Centrální laboratoří SZZ Krnov. Tuto část jsem rozdělila na 3 části. V první části jsou popsány laboratorní metody, které se v laboratoři používají rutinně ke stanovování at' už protilátek nebo antigenů *Chlamydia sp.* Ve druhé části jsou zpracována data pacientů - podle pohlaví, věku a různých diagnostických testů, kterými byla získána a v třetí části jsou uvedeny příklady pozitivních nálezů u pacientů.

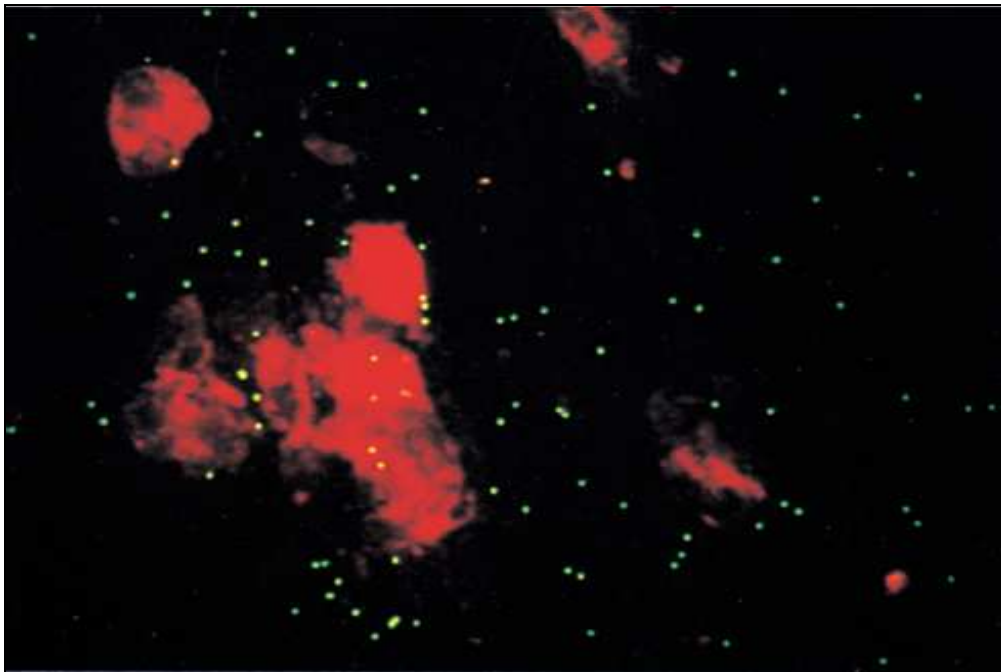
### 7.1 Metody používané v praxi

V této kapitole je uveden přehled konkrétních laboratorních diagnostických metod, které byly použity ke stanovení protilátek v séru pacientů a stanovení antigenu ve výtěrech pacientů. Všechna tyto stanovení byla provedena na oddělení mikrobiologie Centrální laboratoře SZZ Krnov.

#### 7.1.1 Příčný imunofluorescenční test (IFA)

- Používá se pro identifikaci *Chlamydia trachomatis* v urogenitálních, příp. rektálních vzorcích od dospělých pacientů, v okulárních a nasofaryngeálních vzorcích od pediatrických pacientů. Základem pro vyšetření je správně odebraný výtěr z infikovaných míst a zhotovení mikroskopického preparátu (měla by být použita speciální souprava pro odběry – sterilní odběrový tampon, odběrové sklíčko, fixační roztok). Do ordinací lékařů odběrové pomůcky dodává laboratoř. Personál je poučen o provádění odběru.
- Diagnostická souprava: BIO-RAD PATHFINDER *Chlamydia trachomatis*
- **Princip testu:** Test používá monoklonální protilátku konjugovanou s fluoresceinem. Tato barevně reaguje s hlavním vnějším membránovým proteinem (MOMP) elementárního i retikulárního tělíska. Na sklíčko s odběrem se nanese monoklonální protilátka konjugovaná s fluoresceinem. Protilátka se váže na vnější membránový protein elementárního i retikulárního tělíska. Poté následuje inkubace, opláchnutí a nakonec tzv. zamontování krycím sklíčkem. Takto připravený preparát se prohlíží ve fluorescenčním mikroskopu, kde porovnáváme intenzitu fluorescenčního záření. (Laboratorní návod k diagnostické soupravě BIO-RAD PATHFINDER *Chlamydia trachomatis*, 2008, Šifaldová, 2008) (viz. obr. 2 a 3 )

Obr. 2: **Pozitivní nález** urogenitálního přímého vzorku - zvětšeno 400krát. Červeně zbarvené jsou napadené epitelové buňky, zeleně fluoreskující jsou extracelulární elementární tělíska chlamydií.



Obr. 3: **Negativní nález** urogenitálního přímého vzorku - zvětšeno 400x. Červeně zbarvené vidíme vždy epitelové buňky z odebraného vzorku, bez jejich přítomnosti je vzorek považován za neprůkazný.



### 7.1.2 Nepřímé stanovení hodnoty titru protilátek (ELISA)

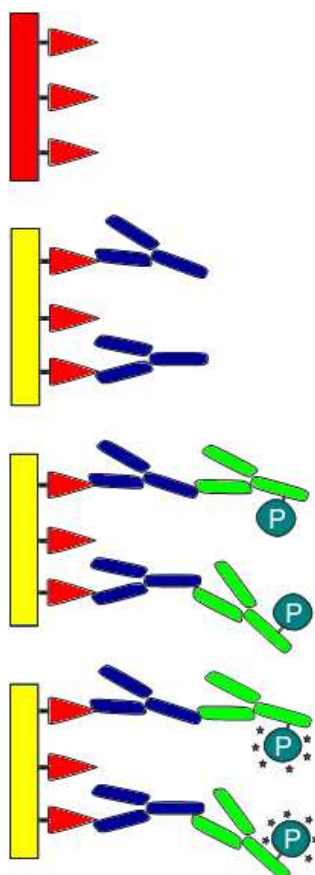
- Jedná se o kvalitativní stanovení hodnoty titru IgA a IgG protilátek proti *Chlamydia sp.* metodou ELISA. Použitý antigen je molekulárně definovaný, geneticky syntetizovaný. Výsledek testu neposkytuje informaci o tom, jakým chlamydiálním druhem byl pacient infikován (Laboratorní návod k soupravě firmy Medac, 2010).
- Diagnostická souprava: Chlamydien-IgA-rELISA medac a Chlamydien-IgG-rELISA medac.
- **Princip testu:** Test je založen na průkazu protilátek v krevním séru proti rodově specifickému chlamydiálnímu antigenu LPS (viz. obr. 3), který je pro ně charakteristický. Mikrotitrační destička je pokryta syntetickým rekombinantem fragmentu LPS (antigenem). Při reakci se na něj selektivně navážou specifické protilátky ze séra pacienta. Na tento komplex se navážou zvířecí protilátky, konjugované křenovou peroxidázou, následuje přidání substrátu. Enzym křenová peroxidáza štěpí tento navázaný substrát a vytvoří se barevný komplex, reakci zastavíme přidáním stopovacího roztoku. Odečítáme hodnotu optické density při určité vlnové délce fotometricky. Máme stanoveny limitní hodnoty pro negativní a pozitivní kontrolu, i pro střední hodnotu cut-off. Pro každý vzorek vypočítáváme podle hodnoty optické density konečnou hodnotu titru protilátek. Pak můžeme určit, zda se jedná o výsledek negativní, hraniční či pozitivní.

### 7.1.3 Nepřímé stanovení přítomnosti protilátek (Westernblott)

- Provádíme kvalitativní stanovení přítomnosti IgA a IgG protilátek v krevním séru již proti jednotlivým rodům *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* a *Chlamydophila psittaci* metodou Westernblott. Metoda slouží především ke confirmaci výsledků vyšetřených metodou ELISA.
- Diagnostická souprava: Chlamycheck IgG a IgA.
- **Princip testu:** Na nitrocelulózkové membráně jsou navázány rekombinační antigeny specifické pro jednotlivé druhy. Test je založen na průkazu protilátek proti nim. Po přidání patientského séra se protilátky navážou na jednotlivé konkrétní antigeny. Vytvoří se komplex antigen-protilátka, který se nám v případě positivity zviditelní jako proužek na membráně, tzv. band. Díky oddělenému rozložení jednotlivých antigenů na

membráně nám souprava umožňuje bezpečnou identifikaci druhově specifických protilátek proti předním antigenům *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* a *Chlamydophila psittaci* současně (obsahuje antigen MOMP pro detekci *Chl.tr.*, *Chl.pn.* a *Chl.ps.*, antigen OMP 2 pro detekci *Chl.tr.* a *Chl.pn.*, antigen Hsp 60 a MIP pro detekci *Chl.tr.*, antigeny OMP4 a OMP 5 pro detekci *Chl.pn.*). Výsledek odečítáme podle přiložené šablony. Tato metoda se používá ke confirmaci výsledků testů ELISA (Laboratorní návod k soupravě firmy Chlamycheck, 2010).

Obr. 4 **ELISA princip** - mikrotitrační destička – žlutá, je pokryta syntetickým rekombinantem fragmentu LPS – červená barva, specifické protilátky ze séra pacienta - modrá barva, peroxidázou značené - P - konjugované zvířecí protilátky – světle zelená barva (Šifaldová, 2008).



## 7.2 Souhrn a zpracování získaných dat

Data jsem sbírala v období od 2.1.2008 do 24.2.2010. Všichni pacienti byli odesláni na odběr s podezřením na chlamydiovou infekci a byli vyšetřeni některou z výše uvedených metod. Všechna data jsem roztřídila do skupin pacientů podle různého věku a pohlaví a podle použitých metod.

### 7.2.1 Selekcce pacientů podle pohlaví a použitých metod

Tabulka 1: Počet vyšetřených mužů a žen, bez ohledu na věk pacienta a druh metody

Pohlaví pacienta	Počet vyšetření
Muž	2152
Žena	3745
Celkem	5897

Za dané časové období se v laboratoři vyšetřilo 5897 pacientů. Z uvedených dat vyplývá, že se vyšetřilo více žen než mužů. Většina vyšetřovaných žen byla odeslána z gynekologických ambulancí.

Tabulka 2: Počet provedených vyšetření u mužů a žen třemi různými metodami, výše uvedenými, bez ohledu na věk pacienta

Metoda / pohlaví	ELISA	WB	IFA
Muži	2018	325	113
Ženy	2354	348	962
Celkem	4372	673	1075

(WB – Westernblott, IFA – imunofluorescenční test)

Z uvedené tabulky je patrné, že nejčastějším typem laboratorního vyšetření je rutinně používaný nepřímý test ELISA, jak u mužů, tak u žen. WB se skutečně dle zpracovaných dat používá jen jako konfirmační test v případě pozitivních výsledků ELISA testu.

IFA jako přímý test se používá nejvíce u žen. Z počtu vyšetření vyplývá, že bylo vyšetřeno 9x více odběrů žen než mužů. Domnívám se, že je zde přímá souvislost s gynekologickými prohlídkami, při kterých jsou ženám odebírány speciální urogenitální výtěry na mimo jiné i na prokázání chlamydiové infekce.

### 7.2.2 Selekce pacientů podle pohlaví a různých věkových kategorií – ELISA, WB

V tabulce máme uvedeny počty pozitivních výsledků vzhledem k celkovému počtu vyšetření. Použité metody: ELISA ve třídě IgA a IgG, WB *Chl.tr.* a *Chl.pn.*

Tabulka 3: Počet vyšetřených mužů rozdělených podle věkových kategorií, kteří byli vyšetřeni metodami ELISA a WB. U každé metody je uveden počet pozitivních výsledků konkrétního vyšetření

Věk mužů	Celkem	ELISA IgA pozitivní	ELISA IgG pozitivní	WB Chl.tr. pozitivní	WB Chl.pn. pozitivní
do 10 let	204	-	-	-	-
11 - 15	88	-	-	-	-
16 - 25	219	-	8	3	5
26 - 40	400	10	43	7	32
41 - 60	661	5	46	27	47
61 a více	550	9	45	12	46

(ELISA - třídy protilátek: IgA a IgG, WB – Westernblott, *Chl.tr.* – *Chlamydia trachomatis*, *Chl.pn.* – *Chlamydophila pneumoniae* )



Tabulka 4: Počet vyšetřených žen rozdělených podle věkových kategorií, kteří byli vyšetřeni metodami ELISA a WB. U každé metody je uveden počet pozitivních výsledků konkrétního vyšetření.

Věk žen	Celkem	ELISA IgA pozitivní	ELISA IgG pozitivní	WB Chl.tr. pozitivní	WB Chl.pn. pozitivní
do 10 let	155	-	2	-	-
11 - 15	80	1	1	-	1
16 - 25	653	8	35	9	3
26 - 40	1157	10	58	20	29
41 - 60	1204	12	58	47	42
61 a více	477	6	23	8	11

(ELISA - třídy protilátek: IgA a IgG, WB – Westernblott, *Chl.tr.* – *Chlamydia trachomatis*, *Chl.pn.* – *Chlamydomphila pneumoniae* )

Záměrně jsou sloučeny výsledky konfirmačního vyšetření metody WB k výsledkům metody ELISA. Z rozdělení dle věku je patrné, že pozitivní nálezy nacházíme až ve skupinách od 16 let. Nejvíce pozitivních nálezů je ve skupinách pacientů ve fertlím věku a to u obou pohlaví. Zajímavé je, že u žen je procento pozitivních nálezů jak pro *Chl. tr.*, tak pro *Chl. pn.* stejné, zatímco u mužů je výrazně vyšší procento pozitivních nálezů u *Chl. pn.*

### 7.2.3 Selekcce pacientů podle pohlaví a různých věkových kategorií - IFA

Při odebírání přímých vzorků je potřeba si uvědomit, že při prokázané pozitivitě je na místě nejen přeléčení pacienta, ale i provedení kontrolního odběru, abychom zjistili úspěšnost léčby. Samozřejmostí by mělo být vyšetření a přeléčení sexuálního partnera pozitivního pacienta. V tabulkách 5 a 6 je uveden celkový počet vyšetřených, kolik z nich bylo pozitivních a kolik z nich se dostavilo na opakovaný odběr.

**Tabulka 5: Počet vyšetřených mužů podle věkových kategorií, kteří byli vyšetřeni imunofluorescenční metodou k přímému průkazu antigenu Chl.tr.**

Věk mužů	Počet vyšetření IFA	Odb.1 pozitivní	Odb.2 pozitivní	Počet pacientů - opakovaný odběr
16 - 25	14	2	1	2
26 - 40	34	2	1	2
41 - 60	43	3	4	2
<b>Celkem</b>	91	7	6	6

(IFA – imunofluorescenční test, *Chl.tr.* – *Chlamydia trachomatis*, Odb.1 – znamená odběr provedený před masáží prostaty, Odb.2 – znamená odběr provedený po masáži prostaty)

**Tabulka 6: Počet vyšetřených žen podle věkových kategorií, které byly vyšetřeny imunofluorescenční metodou k přímému průkazu antigenu Chl.tr.**

Věk žen	Počet vyšetření IFA	Odb.1 pozitivní	Odb.2 pozitivní	Počet pacientů - opakovaný odběr
16 - 25	236	20	23	1
26 - 40	470	12	11	0
41 - 60	212	8	4	1
<b>Celkem</b>	918	40	38	2

(IFA – imunofluorescenční test, *Chl.tr.* – *Chlamydia trachomatis*, Odb.1 – znamená odběr provedený z exocervixu , Odb.2 – odběr provedený z endocervixu )

Z uvedených dat vyplývá, že z celkového počtu vyšetřených mužů je u 7,7 % potvrzena pozitivita. U žen je u 4,4 %, což znamená, že přestože byl vyšetřen přibližně trojnásobný počet žen než mužů, výsledná pozitivita je u mužů takřka dvojnásobná. Dále je překvapující, že téměř všichni pozitivní muži se dostavili po přeléčení na opakovaný odběr, u žen máme z prokázaných pozitivních 40 patientek pouze 2 opakované odběry.

## 7.3 Příklady pozitivních nálezů

V této části jsem vybrala z nasbíraných dat typické příklady pozitivních nálezů pro jednotlivé metody průkazu.

### 7.3.1 Příklad pozitivního nálezu protilátek proti chlamydiím metodami ELISA a WB u vybraných pacientů

U metody ELISA je uvedena koncentrace protilátek v příslušné třídě, kterou považujeme za pozitivní od hodnoty 400 a vyšší, hraniční hodnota je 200, u metody WB je + označení pro pozitivní výsledek vyšetření. Datum vyšetření uvádím pouze tehdy, má-li pacient opakovaný odběr.

Tabulka 7: Pacient č.1 - muž

Věk	Dg.	Popis diagnózy	Datum vyšetření	ELISA IgA	ELISA IgG	WB Chl.tr.	WB Chl.pn.
40	M25.5	Bolesti kloubů	17.4.2008	100	400	-	+
	M25.5	Bolesti kloubů	24.4.2008	100	400	nevyšetřeno	nevyšetřeno
	M13.9	Artritida	19.5.2008	100	400	nevyšetřeno	nevyšetřeno

Odběr pacienta byl odeslán z ortopedické ambulance. Toto je typický nálezu pacienta s pozitivitou jak ve třídě IgG metodou ELISA, tak při confirmaci metodou WB, kde jsme zjistili pozitivitu na *Chl.pn.*. Výsledky WB na průkaz *Chl. pn.* vycházejí pozitivní, protože většina těchto pacientů je odeslána z plicních oddělení s respiračními onemocněními k průkazu pneumonie. Výsledky WB na průkaz *Chl.tr.* vycházejí většinou negativní u žen i u mužů, neboť je zde více využívána možnost přímého průkazu ze stěrů.

Tabulka 8: Pacient č.2 - muž

Věk	Dg.	Popis diagnózy	Datum vyšetření	ELISA IgA	ELISA IgG	WB Chl.tr.	WB Chl.pn.
28	J042	Akutní zánět hrtanu	3.3.2008	400	400	nevyšetřeno	nevyšetřeno
	399	Nemoc HCD	25.3.2008	200	400	-	+
	J042	Akutní zánět hrtanu	5.5.2008	200	400	-	+

Odběr pacienta byl odeslán z plicní ambulance. Pacient měl pravděpodobně právě probíhající akutní respirační infekci, vzhledem k vysokým protilátkám IgA v prvním odběru. V následujícím odběru pozorujeme jejich snížení, ale stále je patrná jejich produkce. Výsledek by mohl odpovídat léčbě antibiotiky. Ve třetím odběru je situace stejná, což může ukazovat na nedostatečnou léčbu nebo již přechod do chronické fáze infekce. Pro přesnější zhodnocení nám chybí další vyšetření i klinické projevy.

Tabulka 9: **Pacient č. 3 - žena**

Věk	Dg.	Popis diagnózy	Datum vyšetření	ELISA IgA	ELISA IgG	WB Chl.tr.	WB Chl.pn.
34	M13	Artritida	3.3.2009	400	800	nevyšetřeno	nevyšetřeno
	M13	Artritida	17.4.2009	400	800	nevyšetřeno	nevyšetřeno
	M13.9	Artritida NS	22.6.2009	800	1600	+	+

Odběr pacientky byl odeslán z ortopedické ambulance. Vzdávající hodnoty u ELISA vyšetření a pozitivní výsledky u WB u třetího odběru signalizují akutní fázi infekce. Působením antibiotik na chlamydie může dojít k vyplavování toxinů z bakterií a ty pak negativně působí na tkáň kosti a chrupavky. Jde o pacientku s typickým příkladem systémového onemocnění artritidy. Pro přesnější zhodnocení nám opět chybí jak další vyšetření, tak klinické projevy.

Tabulka 10: **Pacient č. 4 – žena**

Věk	Dg.	Popis diagnózy	Datum vyšetření	ELISA IgA	ELISA IgG	WB Chl.tr.	WB Chl.pn.
37	J30.1	Alergická rýma	26.9.2008	400	400	nevyšetřeno	nevyšetřeno
	K52.2	Alergická a dietetická gastroenteritida a kolitida	27.4.2009	800	1600	nevyšetřeno	nevyšetřeno

Odběr pacientky byl odeslán z alergologické ambulance. První odběr odpovídá latentní infekci. Alergické reakce potencují odezvu imunitního systému. Zvýšení koncentrace protilátek v následujícím odběru, tak mohlo být způsobeno probíhající alergií a nemuselo znamenat probíhající infekci. U tohoto odběru by bylo velmi vhodné konfirmovat výsledek ELISA testu metodou WB, abychom mohli s jistotou vyloučit, že respirační potíže, kterými pacientka pravděpodobně trpěla, nebyly způsobené infekcí *Chl. pn.*

### 7.3.2 Příklady výsledků imunofluorescenčního testu (IFA) k přímému průkazu antigenu *Chl.tr.* v urogenitálních vzorcích u vybraných pacientů

Vysvětlivky k tabulkám: IFA – imunofluorescenční test, + je označení pro pozitivní výsledek vyšetření, *Chl.tr.* – *Chlamydia trachomatis*, odb.1 – u žen znamená odběr provedený z exocervixu, odb.2 – u žen odběr provedený z endocervixu. Všichni pacienti muži byli odesláni z urologické ambulance, ženy z gynekologické.

Tabulka 11: **Pacient č. 1 - muž**

Věk	Dg.	Popis diagnózy	Datum vyšetření	IFA odb.1	IFA odb.2
43	R36	Výtok z penisu	9.1.2009	+	+
			30.1.2009	-	+
			22.3.2009	-	-

Z prvního odběru je jasná pozitivita jak z výtěru z močové trubice před masáží prostaty, tak i po masáži prostaty, což svědčí pro akutní infekci. Pacientovi byly nasazeny antibiotika. Při kontrolním odběru po přeléčení byl pozitivní odběr pouze po masáži, což svědčí o tom, že z močové trubice byly již chlamydie vymýceny. A po 2 měsících léčení má již pacient oba odběry negativní, což znamená, že byl pacient úspěšně přeléčen.

Tabulka 12: **Pacient č. 2 - muž**

Věk	Dg.	Popis diagnózy	Datum vyšetření	IFA odb.1	IFA odb.2
24	R36	Výtok z penisu	7.1.2009	-	+
			28.1.2009	-	-

Pacient má pozitivní odběr pouze po masáži, což znamená, že se může jednat o počínající infekci, nebo o chronický typ infekce. Po úspěšném přeléčení antibiotiky má pacient výsledky obou výtěrů negativní.

Tabulka 13: **Pacient č. 3 - muž**

Věk	Dg.	Popis diagnózy	Datum vyšetření	IFA odb.1	IFA odb.2
25	N34.1	Nespecifická uretritida	4.8.2008	-	-
	N34.2	Nespecifická uretritida - vřed	8.12.2008	-	-
			13.5.2009	-	-

Pacient je ze všech odběrů stále negativní, což prokazuje že nespecifickou uretritidu mu způsobují zcela jiné patogeny než *Chl.tr.*.

Tabulka 14: **Pacient č. 4 - žena**

Věk	Dg.	Popis diagnózy	Datum vyšetření	IFA odb.1	IFA odb.2
19	A56	Chlamydiová infekce	22.6.2008	-	+
			11.8.2008	+	+
			4.11.2008	-	+

Podle výsledků vyšetření je patrné, že při prvním odběru byla pacientka pozitivní pouze na stěr z endocervixu, v následném odběru po léčbě na exocervix i endocervix, a v posledním odběru opět na endocervix. Je vidět, že přeléčení u této pacientky bylo neúspěšné, ve všech třech odběrech má stále pozitivní odběr z endocervixu a onemocnění patrně přešlo do chronicity. Negativní výsledek u odběru z exocervixu nemusí prokazovat negativitu. Výsledek může být falešně negativní a mohl být způsoben např. chybou při provádění odběru.

Tabulka 15: **Pacient č. 5 - žena**

Věk	Dg.	Popis diagnózy	Datum vyšetření	IFA odb.1	IFA odb.2
45	A56	Chlamydiová infekce	13.11.2008	+	+
			3.6.2009	+	+

Podle výsledků vyšetření je patrné, že u této pacientky byla léčba neúspěšná, má stále pozitivní odběr z exocervixu i endocervixu. Onemocnění přešlo do chronicity.

## 8 Diskuze

Z výsledků laboratorních vyšetření uvedených v jednotlivých tabulkách s příslušným komentářem se dá usuzovat, že v rámci diferenciální diagnostiky se na chlamydiové infekce skutečně příliš nepomýšlí. Jednoznačně jsme prokázali, že bylo vyšetřeno více žen než mužů. Většina pacientek je odesílána z gynekologických ambulancí.

Převažující počet vyšetřených žen může být ovlivněn pravidelnými gynekologickými prohlídkami, ale i tím, že urogenitální infekce má u žen velmi typické příznaky (bolestivé zapáchající výtoky, nepříjemné svědění atd.), zatímco u mužů v 80 % probíhá infekce asymptomaticky. Takže na rozdíl od žen nemají muži potřebu vyhledávat lékaře. Další věc, kterou jsme prokázali, je skutečnost, že *Chl tr.* patří mezi STD. Protože nárůst počtu vyšetření i nárůst pozitivních vzorků stoupá vzhledem k fertilnímu věku, respektive k období sexuální aktivity bez ohledu na pohlaví.

Dále z uvedených výsledků vyplývá, že metodou ELISA se většinou vyšetřují pacienti s respiračními infekcemi při podezření na infekci *Chl.pn.*, anebo pacienti se systémovým onemocněním typu artritidy při podezření na infekci oběma patogeny. Proto pokud prokážeme pozitivitu v ELISA testu, tak se konfirmací prokáže pozitivita především u rodu *Chl.pn.*, nikoliv u *Chl tr.*. U pozitivitu v ELISA testu je velmi důležitá konfirmace metodou WB, protože řada lidí onemocní touto chorobou již v dětském věku a většina z nich si nese vysoký titr protilátek i do dospělosti.

Naopak *Chl.tr.*, patřící mezi STD, se vyšetřuje především z urogenitálních výtěrů. Zde máme také více vyšetřených žen než mužů. Překvapivě pozitivita u mužů je téměř dvojnásobná než u žen. Dle mého názoru je to proto, že muži netrpí urogenitálními infekcemi tak často jako ženy a navíc většina infekcí probíhá symptomaticky. Pokud se nějaké symptomy objeví, dá se pozitivita očekávat. U žen mohou být urogenitální infekce s podobnými symptomy způsobeny celou řadou jiných patogenů.

Snažila jsem se vybrat a okomentovat nejběžnější nálezy diagnostikované infekce *Chl.tr.* i *Chl.pn.* u mužů i u žen. Z výsledků je patrné, že diagnostika i léčba chlamydiových infekcí je problematická a složitá. Je důležité výsledky správně okomentovat vzhledem ke všem vyšetřením, předchozím nálezům a klinickým projevům



pacienta. Je potřeba stanovit algoritmus léčby na každý konkrétní případ (dávkování, průnik do tkání, vysoká nitrobuněčná koncentrace, minimum vedlejších účinků atd.). Důležité je zvolit správné antibiotikum. Při akutní infekci je potřeba, aby léčba byla zprvu razantní, jinak je pak zbytečně zdlouhavá. U infekcí *Chl.tr.* (jedná se o STD) je naprosto nezbytné vyšetřit a léčit oba partnery současně. Jinak neustále dochází k reinfekcím. A přestože chlamydie léčíme, léčba je neúspěšná a onemocnění přechází do chronicity.

Stavům chronické i perzistentní infekce lze předejít právě správnou a včasnou diagnostikou, správně zvolenou léčbou akutní infekce a také systematickým vyšetřováním (Horová, 2010). I z našich výsledků je to patrné. Uvedli jsme dvě pacientky, které i přes léčení mají stále výsledky výtěrů pozitivní, jejich onemocnění přešlo do chronicity nebo jsou opakovaně infikovány neléčenými partnery.

Velmi dobrá efektivita výsledků při léčbě urogenitálních chlamydióz je popisována při současném užívání přípravků systémové enzymoterapie s antibiotiky, např. wobenzym nebo chymotrypsin. Při současném podávání antibiotik a proteolytických enzymů dochází ke zlepšení penetrace antibiotik do infikovaných tkání – tzv. efekt vehikula. Podle statistik se vyléčilo více než 90 % pacientů, při léčbě pouze antibiotiky se vyléčilo jen 60 % pacientů (Toršová, 2009).

Vhodné je doplnit léčbu i užíváním probiotik. Probiotika jsou schopna stimulovat vrozenou i získanou imunitu, aktivují fagocytózu, zvyšují imunitu sliznic, obnovují přirozenou mikroflóru. (Sládková, 2009).

U chronických systémových onemocnění se doporučuje podávat vyšší dávky antibiotik, k nim nesteroidní antirevmatika, které ovlivňují lokální zánět v postižené tkáni, proteolytické enzymy k modulaci některých adhezivních molekul a imunomodulační léky (Medková a spol., 2001).

Jak jsem již několikrát uvedla, jestliže se jedná o STD, je nezbytné vyšetřit a léčit i druhého partnera. V praxi se tak nejspíše vždy neděje vzhledem k celé řadě opakujících se pozitivit. Také je zarážející, že z celého souboru pacientek, které byly vyšetřeny na přímý průkaz antigenu, máme opakovaný kontrolní odběr pouze u několika z nich. Ve věkové kategorii fertilního věku od 26 do 40 let nemáme dokonce v uvedeném období ani jednu

pacientku, která by měla opakovaný odběr při pozitivním nález. Naopak muži, jejichž odběry byly pozitivní, mají téměř všichni opakovaný odběr a prokazatelně se vyléčili.

Možná je to způsobeno tím, že po prokázání infekce v prvním odběru dochází k zaléčení, potíže ustoupí a pacienti již na opakovaný kontrolní odběr nejdou, protože ho považují za zbytečný. Nebo mohou být nedostatečně informováni lékařem o důležitosti opakovaného vyšetření. Řada žen patrně vůbec neví, že důsledkem neléčené infekce jsou daleko závažnější onemocnění, jako je třeba neplodnost.

Problematika vaginálních infekcí je složitá i z etického hlediska. Celá řada pacientů se stydí přiznat partnerovi s podezřením na sexuálně přenosnou chorobu. Tím pádem se partner neléčí, zvláště pokud sám nemá žádné viditelné potíže. U mužů je navíc vyšetření velmi invazivní a tak odmítají jít k lékaři. V důsledku toho se stále infekce vrací a léčba je neúspěšná.

Chlamydiální infekce jsou i mezi lékaři často podceňované a myslí se na ně až v poslední řadě. Možná hraje ve vyšetřovacím algoritmu svou roli i ekonomika. Laboratorní vyšetření na chlamydiové infekce je náročné a tudíž i velmi drahé. I toto by mohlo být příčinou malého počtu opakovaných odběrů po přeléčení.

## 9 Závěr

Ve své práci jsem se snažila seznámit s jednotlivými patogeny způsobující chlamydiové infekce, ať už STD způsobené *Chl.tr.* nebo respirační onemocnění související s infekcí *Chl.pn.*. Chtěla jsem poukázat na to, že mají vysokou antigenicitu a že se velmi dobře maskují před reakcí imunitního systému a velmi často proto přecházejí chlamydiové infekce do chronicity. Jsou pak velmi obtížné léčitelné.

Popsala jsem nejen způsoby laboratorní diagnostiky, ale i možnosti léčby pacientů s chlamydiovými infekcemi. I na relativně malém souboru pacientů jsme prokázali, že chlamydiové infekce nejsou zase tak časté. Nabízí se otázka, zda je to způsobeno tím, že jsou obtížně detekovatelné nebo že jsou stále mezi lékaři podceňované a myslí se na ně až v poslední řadě.

I u prokázaných chlamydiových infekcí je léčba problematická a složitá. Stále se jeví jako nedostatečná. Tento efekt není pravděpodobně způsoben rezistencí chlamydií na příslušná antibiotika ani jejich perzistencí po dlouhou dobu ve tkáních, ale právě nedostatečným a včasným diagnostikováním. Jejich klinické projevy jsou zavádějící, mohou být často překryty symptomy celé řady jiných infekcí. Tím, že se tyto infekce vyšetřují až při negativním průkazu jiných patogenů, má chlamydiová infekce dlouhou dobu na to, aby se mohla plně rozvinout. Pak je bohužel k jejich léčení potřeba drastický zásah do organismu. Onemocnění se klinicky projevuje tím, že dojde k imunopatologické reakci organismu a k zánětlivé aktivitě se změnami ve tkáních a pak i s morfológickými změnami na orgánech. Stále máme málo průkaznou laboratorní diagnostiku u akutních i chronických forem infekcí (Toršová, 2009).

Diagnostika se však stále zlepšuje, proto je pro lepší diagnostikování a léčení chlamydiových infekcí potřeba zavádět a používat v klinické praxi propracovanější imunologické metody a moderní molekulárně biologické metody (Horová, 2010). I přestože se takto děje a používají se již mnohem častěji i moderní molekulárně biologické metody, úspěšnost léčby stále zcela závisí na správně provedeném odběru, současném vyšetřování partnerů a opakovaných kontrolních odběrech.

## 10 Seznam použité literatury

GÖPFERTO VÁ, D., PAZDIORA, P., DÁŇOVÁ, J.: *Epidemiologie infekčních nemocí*, UK v Praze, Karolinum, 2002, ISBN 80 – 246 – 0452 – 3

GRAYSTON, J. T., KUO, C. C., CAMPBELL, L. A., WANG, S. P.: *Chlamydia pneumoniae sp. nov. for Chlamydia sp.*, Strain Twar. Int. J. of Syst. Bact., 39, 1989 (**Citace tohoto autora je převzata z knihy:** VĚŽNÍK, Z., POSPÍŠIL, L.: *Chlamydiové infekce*, Institut pro další vzdělávání pracovníků v Brně, 1997, ISBN 80 – 7013 – 246 – 9)

HOLMES, K. K., MARDH, P. A., SPARLING, P. F., WEISNER, P. J.: *Sexually transmitted diseases*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1984 (**Citace tohoto autora je převzata z knihy:** VĚŽNÍK, Z., POSPÍŠIL, L.: *Chlamydiové infekce*, Institut pro další vzdělávání pracovníků v Brně, 1997, ISBN 80 – 7013 – 246 – 9)

HOROVÁ, B.: *Chlamydiové infekce v gynekologii, pohled mikrobiologa*, Sborník abstrakt: Chlamydiová infekce – zákeřný nepřítel, I. konference: 23.10.2009 Praha, ISBN 978 – 80 – 87327 – 17 - 3

HOROVÁ, B.: *Směr diagnostiky a léčby chlamydiových infekcí se zaměřením na Chl.pn.* Sborník abstrakt: Chlamydiová infekce – zákeřný nepřítel, II. konference: 18. – 19.6. 2010 Olomouc, ISBN 978 – 80 – 87327 – 17 – 3

HORVÁTH, R.: *Molekulární diagnostika Ch.tr. a Chl.pn.*, Sborník abstrakt: Chlamydiová infekce – zákeřný nepřítel, I. konference: 23. 10. 2009 Praha, ISBN 978 – 80 – 87327 – 17 - 3

JONES, B. R.: *The prevention of blindness from trachoma*, Trans.Ophthal.Soc. UK, 95, 1975 (**Citace tohoto autora je převzata z knihy:** VĚŽNÍK, Z., POSPÍŠIL, L.: *Chlamydiové infekce*, Institut pro další vzdělávání pracovníků v Brně, 1997, ISBN 80 – 7013 – 246 – 9)

KOBILKOVÁ, J., LOJDA, Z., ONDRUŠ, J., BEKOVÁ, A.: *Gynekologická cytodiagnostika*, Galén Praha, 2000, ISBN 80 – 7262 – 044 – 4

KRADIN, R. L.: *Diagnostic Pathology of Infectious Disease*, Sander Elsevier, Philadelphia 2010, ISBN 978 – 1 – 4160 – 3429 – 2

*Laboratorní návod* k soupravě firmy Chlamycheck pro stanovení přítomnosti protilátek proti druhově specifickým antigenům Chl.tr. Chl.pn. a Chl.ps. metodou Westernblott, 2010  
*Laboratorní návod* k soupravě firmy Medac pro stanovení koncentrace protilátek proti rodově specifickému chlamydiálnímu LPS metodou ELISA, 2010

*Laboratorní návod* k diagnostické soupravě BIO – RAD PATHFINDER Chl.tr. pro imunofluorescenční přímý průkaz antigenu Chl.tr., 2008

*Laboratorní příručka* firmy TEST LINE - ELISA Brno, Šedivý, Lukš 2007

MEDKOVÁ Z., KALOUSEK I., JARČUŠKA P.: *Chlamydiové infekce*, Triton Praha, 2001, ISBN 80 - 7254 – 222 – 2

MEISELS, A., MORIN, C.: *Cytopathology of the Uterine Cervix*, ASCP Press Chicago, Canada, 1991, ISBN 0 – 89189 – 299 – 0

MKN - 10, *Mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů*, Desátá verze, tabelární část, ÚZIS ČR Praha 2008, ISBN 978 – 80 – 904259 – 0 - 3

MOORMAN, D. R., SIXBEY, J. W., WYRICK, P. B.: *Interaction of Chlamydia trachomatis with human genital epithelium in culture*. J.Gen.Microbiol., 132, 1986 (**Citace tohoto autora je převzata z knihy:** VĚŽNÍK, Z., POSPÍŠIL, L.: *Chlamydiové infekce*, Institut pro další vzdělávání pracovníků v Brně, 1997, ISBN 80 – 7013 – 246 – 9)

POLCAROVÁ, D.: *Laboratorní diagnostika chlamydií*, Sborník abstrakt: Chlamydiová infekce – zákeřný nepřítel, I. konference: 23. 10. 2009 Praha, ISBN 978 – 80 – 87327 – 17 - 3

RYDLO, J.: *Pedagog a lékař, školství a lékařství – sexuální výchova*, Sborník abstrakt: Chlamydiová infekce – zákeřný nepřítel, II. konference: 18. – 19.6. 2010 Olomouc, ISBN 978 – 80 – 87327 – 17 - 3

SCHACHTER J.: *Biology of Chlamydia trachomatis* In: HOLMES, K.K., MARDH, P. A., SPARLING, P. F., WEISNER, P. J.: *Sexually transmitted diseases*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1984 (*Citace tohoto autora je převzata z knihy*: VĚŽNÍK, Z., POSPÍŠIL, L.: *Chlamydiové infekce*, Institut pro další vzdělávání pracovníků v Brně, 1997, ISBN 80 – 7013 – 246 – 9)

SLÁDKOVÁ, S.: *Terapeutické možnosti využití pro.biotik v ordinaci lékaře*, Sborník abstrakt: Chlamydiová infekce – zákeřný nepřítel, I. konference: 23.10. 2009 Praha, ISBN 978 – 80 – 87327 – 17 - 3

STEPHENS, R. S.: *Molecular Genetics of Chlamydia* In: *Chlamydial Infections* (BOWIE W. R. and col., Rd.) Cambridge University press, Cambridge, 1990 (*Citace tohoto autora je převzata z knihy*: VĚŽNÍK Z., POSPÍŠIL L.: *Chlamydiové infekce*, Institut pro další vzdělávání pracovníků v Brně, 1997, ISBN 80 – 7013 – 246 – 9)

TORŠOVÁ, V.: *Současnost a perspektivy léčby chlamydiových infekcí*, Sborník abstrakt: Chlamydiová infekce – zákeřný nepřítel, I. konference: 23.10. 2009 Praha, ISBN 978 – 80 – 87327 – 17 - 3

ŠEVČÍK P., SKŘIČKOVÁ J., ŠRÁMEK V. a kol.: *Záněty plic v intenzivní medicíně*, Galén Praha, 2004, ISBN 80 – 7262 – 278 – 1

ŠIFALDOVÁ L.: *Seminární práce: Chlamydie - známé i neznámé* (do předmětu: mikrobiologie, 1.r., obor ZBIO kombi, UK v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové), 2008

VĚŽNÍK, Z., POSPÍŠIL, L.: *Chlamydiové infekce*, Institut pro další vzdělávání pracovníků v Brně, 1997, ISBN 80 – 7013 – 246 – 9

VOJÁČEK, J., MALÝ, M.: *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*, Grada Praha, 2004, ISBN 80 – 247 – 0501 – X

VOTAVA, M., a kol.: *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun Brno, 2003, ISBN 80 – 902 – 896 – 6 – 5

WEIDNER, COTE, SUSTER, WEISS: *Modern Surgical Pathology*, Sander Elsevier,  
Philadelphia 2009, ISBN 978 – 1 – 4160 – 3966 - 2

## 11 Seznam zkratek

ATP	Adenosintrifosfát
BAL	Bronchoalveolární laváž
BMG	Typ tkáňových buněčných kultur
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzymová imunoanalýza (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
Hela buňky	Typ tkáňových buněčných kultur
HIV	Virus lidské imunodeficiency (Human Immunodeficiency virus)
HLA	Typ antigenu (Human Leucocyte Antigen)
Hsp 60	Protein tepelného šoku (Heat Shock Protein“ - 60 kDa)
Chl.pn.	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
Chl.ps.	<i>Chlamydophila psittaci</i>
Chl.tr.	<i>Chlamydia trachomatis</i>
IgA	Imunoglobulin, protilátka třídy IgA
IgM	Imunoglobulin, protilátka třídy IgM
IgG	Imunoglobulin, protilátka třídy IgG
IFA	Imunoflorescenční test (Immunofluorescence test Assay)
IL	Interleukin
INF $\gamma$	Interferon gama
LCR	Ligázová řetězová reakce (Ligase Chain Reaction)
LGV	Lymfogranuloma venerum
LPS	Lipopolysacharid
McCoy	Typ tkáňových buněčných kultur
MIC	Minimální inhibiční koncentrace (Minimal inhibitory concentration)
MIF	Mikroimunofluorescenční test (Microimmunofluorescence)
MIP	Specifický antigen Chl.tr. ( Macrophage Infectivity Potentiator )
MOMP	Hlavní vnější membránový protein (Major Outer Membrane Protein)
NK	Nukleová kyselina
NK buňky	Přirození zabíječi – typ bílých krvinek (Natural killers)
OMP	Vnější membránový protein (Outer Membrane Protein)



PBP	Protein vyvazující penicilín (Penicilin binding Protein)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain reaction)
RNA	Ribonukleotidová kyselina
STD	Pohlavně přenosné nemoci (Sexual Transmitted Disease)
Th <sub>1</sub> , Th <sub>2</sub>	Lymfocyty typu T – pomocné (help)
TNF	Tumor nekrotizující faktor
WB	Westernblott