

Biologický korespondenční seminář



Biozvěst

Ročník 3

Série 4

Milí přátelé,

jaro ubíhá kolem nás závratnou rychlostí a stejně rychle utekl i další ročník Biozvěstu, který vrcholí poslední sérií. V poslední sérii semináře Vás čekají opět velmi pestře zaměřené úlohy. Podíváme se ke Středozevnímu moři, zamyslíme se nad ochranou hmyzu, potěšíme se s medvídky, budeme moci pozorovat pučení vegetace a na závěr si něco povíme o diagnostice nemocí v seriálové úloze, která Vás možná i namotivuje na medicínskou dráhu.

Expedice Biozvěstu

Tak jako obvykle, bude seminář zakončen terénní expedicí, která se bude letos konat v termínu 19.-24.6. (od nedělního večera do pátečního dopoledne). Vyrážíme jedné z nejvýše položených osad v Čechách, na Klínové boudy v Krkonoších do chaty Petráška, která nám bude sloužit jako základna k prozkoumávání velehorské přírody. Díky dotaci od MŠMT (v rámci projektu Arachne) bude většina nákladů hrazena, takže Vás účast na expedici nezrujuje ani finančně. Kapacita bude 15-20 účastníků, při velkém zájmu budeme rozhodovat dle počtu bodů po třetí sérii. Chalupa leží v 1200 metrech nad mořem a veškeré zásoby si budeme muset na celý týden vynést vlastní silou. Za vynaloženou námahu budeme ale mnohokrát odměněni jedinečným kouzlem života na horách.

Přihlášky obdržíte během května.



Jak řešit

Veškeré pokyny k řešení semináře získáte na internetové stránce Biozvěstu

www.studiumbiologie.cz/biozvest

(nebo zadejte „Biozvěst“ do Google). Na stránce také naleznete přihlášku, kterou vyplíte. Úlohy Vám budeme zasílat automaticky na e-mail uvedený v přihlášce. Pokud budete chtít ukončit odběr novinek o Biozvěstu, napište nám e-mail.

Dále se k nám můžete připojit prostřednictvím Facebooku, skupina „Biozvěst“, kde je možná probírat aktuality diskutovat dle libosti.

<https://www.facebook.com/groups/175384482597684/>

Vaše řešení úloh nám posílejte na adresu:

biozvest@gmail.com

Nejpraktičtější formou řešení bude prostý text v e-mailu, ale přijímáme veškeré formáty příloh. Každou úlohu pište do samostatného e-mailu a v předmětu uveďte

Ročník-Série-Úloha-Jméno_Příjmení,

např. **3-1-2-Bioslav_Biomilný** v případě druhé úlohy první série aktuálního ročníku.

Uzávěrka 4. série: pondělí 30.5.2016 o půlnoci.

V případě opožděného odevzdání úloh se strhává za každý celý den jeden bod s výjimkou zvláště závažných a omluvených situací.

Nelekejte se, když Vám přijdou úlohy na první pohled příliš těžké, ponořte se do informačních zdrojů a uvidíte, že na vše lze někde nalézt odpověď. Dobré tipy k řešení naleznete také na stránce Biozvěstu v sekci „Návody“. Není nutné abyste kompletně vyřešili všechny úlohy a asi se to ani nikomu nepodaří, stačí odeslat libovolně velký fragment. Oceníme, pokud přiložíte jakékoliv připomínky (např. úloha byla příliš lehká/těžká, nesrozumitelná, nudná), úlohy se pokusíme tvořit k Vaší maximální spokojenosti.

Veškeré dotazy či připomínky směřujte na adresy

biozvest@gmail.com či vosolsob@natur.cuni.cz

Mnoho zdaru při řešení Vám za kolektiv autorů přeje

Stanislav Vosolsobě

Jazyková revize: Kristýna Minářová

Úloha 1: K moři

Autor: Jasna Simonová

Počet bodů: 18

Přestože je v Čechách stále dosti zima, jaro a následující léto už se blíží. Mnozí z vás jistě už podrobněji plánují letní prázdniny a za pošmourných dnů sní o rozmanité biodiverzitě, která se už brzy probudí k nové aktivitě a kterou budou v létě objevovat, zkoumat a obdivovat. Pro nás cizokrajnou biodiverzitou, kterou vídáme často právě o prázdninách, jsou organismy žijící v moři. Pojdme se tedy podívat blíže ke Středozevnímu moři a k tomu, co v něm žije.

1. Okolí Středozevního moře je k nám nejbližším biodiverzitním hotspotem (místem, kde je globálně vysoká biodiverzita). Zkuste vymyslet alespoň tři důvody, proč je právě ve Středomoří diversita tak vysoká.
2. Abychom lépe pochopili, proč dnešní biota vypadá tak, jak vypadá, je často užitečné podívat se do minulosti (někdy i do té geologické). Jak vlastně vzniklo Středozevní moře? Mění se dnes nějak jeho velikost?
3. Na dnešní biotu Středozevního moře má významný vliv jeden lidský stavební počín z 19. století. Co lidé tak významného pro organismy Středozevního moře postavili? Jaký proces byl touto stavbou spuštěn? (Nazývá se podle jejího hlavního inženýra.) Jedná se o v tomto území historicky ojedinělou stavbu?
4. Na obrázku vidíte jednoho účastníka výše zmíněného procesu. Pokuste se jej co nejpodrobněji taxonomicky zařadit.



5. Na dně některých částí Středozemního moře můžeme najít evapority miocénního stáří. Jak evapority vznikají? Jak je možné, že je nacházíme na dně moře? Jak jejich vznik může souviset s dnešní diverzitou Středomoří?
6. Krásnými živočichy, které můžete ve Středomořím moři potkat, jsou žebnatky (Ctenophora). Přesto, že mohou dorůstat značné velikosti (až kolem metru), pohybují se většinou brvami umístěnými na podélných žebrech (ctena), které navíc krásně odrážejí světlo v duhových barvách. Kromě této nepravé luminiscence, jsou schopny i bioluminiscence pravé. K lovu používají lepivé buňky koloblasty umístěné především na tykadlech. V roce 2014 se objevil překvapivý názor na fylogenetické postavení žebenatek. Kterým živočichům by mohly být žebnatky příbuzné? Co Moroze a kol. k takovému názoru vedlo?
7. Houby (Porifera) patří mezi nepochybně fascinující živočichy. Od křídly se jejich současné rody téměř nezměnily, mají velmi jednoduchou netkáňovou tělní stavbou, nicméně jsou už schopny třeba koordinovaných pohybů zajišťujících proudění vody tělem houby nebo kontinuálního růstu. Čeleď Cladorhizidae dokonce umí aktivně lovit malé korýšky, které zachytí jehlicemi a stráví pomocí buněk, které kořist postupně obklopí. Houby mohou být také domovem jiných živočichů. Kdo na vás může vykouknout z houby *Euplectella aspergillum*? V jaké houbě byste hledali korýše *Paguristes eremita*? Houby často obsahují různé medicínsky zajímavé látky? Proč tyto látky nacházíme právě v houbách?
8. Velmi důležitými mořskými bezobratlými jsou také korály. V poslední době se často mluví o jejich ohrožení tzv. **bělením** (angl. bleaching). Na tomto procesu je dobře vidět možná křehkost symbiotických vztahů, které přitom mohou být zásadní pro fungování celých ekosystémů. V čem bělení korálů spočívá? Jaký faktor prostředí je pro korály nejrizikovější?
9. Ve Středomoří můžeme objevit i velmi podivné živočichy, kteří loví velmi dlouhým chobotem (proboscis), který může obsahovat i jedový bodec. Do jakého kmene patří? Jak dlouhý může být světově nejdelší zástupce této skupiny?
10. Někdy při ponoření hlavy pod hladinu můžete slyšet jakési praskání. Jde o střelbu „pistolníků“ z čeledi Alpheidae. Proč střelí? A jak to dělají?
11. Měkkýše, alespoň plže a mlže, si často představujeme jako poměrně neškodná a pomalá zvířátka. Nicméně i v této skupině najdeme zástupce, kteří nás určitě

překvapí. Pokuste se najít na internetu videa nějakého rychlého a nějakého dravého mořského plže nebo mlže. Do řešení úlohy zkopírujte jejich URL adresu a připojte krátký vysvětlující komentář.

12. Při pohledu pod vodu určitě na mnohých místech uvidíte takové krásně roztažené vějíře, které se při i jen jemném podráždění stáhnou do kulaté dírky nebo trubičky. Komu patří? Která část těla je tvoří?

13. BONUS: Kdo to na vás kouká?



Úloha 2: Hmyz a jeho ochrana očima veřejnosti

Autor: Jan Pražák

Počet bodů: 20

Hmyz patří bezesporu k jedné z nejoblíbenějších ale zároveň i nejnenáviděnějších skupin živočichů. V této úloze se zaměříme na to, jak tuto živočišnou třídu vnímá neodborná veřejnost a co za těmito postoji stojí.

1. Nejdříve se pokuste přijít na to, jaké mají běžní lidé o hmyzu povědomí a znalosti. Zeptejte se 20 – 30 lidí (např. vašich spolužáků, příbuzných apod.) na tyto otázky, pomocí kterých zjistíte rozšířenost nejčastějších chybných domněnek o hmyzu:

- a) Kolik má hmyz nohou?
- b) Řadí se do hmyzu pavouci?
- c) Jak vypadá mládě mouchy?

Odpovědi jednoduše zpracujte (vytvořte např. tabulky odpovědí a jejich procentuální zastoupení) a slovně zhodnoťte. Kvalitativní odpovědi si rozdělte do několika skupin (např. odpověď muška, malá moucha a drobná muška můžete zařadit do jedné kategorie odpovědí).



2. Znalost těchto základních informací a souvislostí je sice důležitá, nicméně pro hmyz samotný je zásadnější postoj k němu a tedy i jeho ochrana. Lidé sice hmyz nějakým způsobem chrání, nicméně k jeho ochraně jsou mnohem menší tendence, než k ochraně např. velkých zvířat, měkkýšů, korálů atd. Napište alespoň tři faktory, které

tendenci k ochraně hmyzu výrazně zmenšují.

3. I v rámci hmyzu se ale najdou skupiny nebo jednotlivé druhy, na které se v ochranářství nezapomíná a dostává se jim péče mnohem větší než ostatním. Jmenujte alespoň jednu skupinu a alespoň pět konkrétních druhů hmyzu, které jsou (v České republice) tohoto dokladem a vysvětlete, proč jsou chráněny více než většina ostatního. Náповědou je, že to opět souvisí zejména s neodborným pohledem veřejnosti.
4. Tyto organismy mohou ochranáři využít k ochraně dalších, jinak zapomínaných, druhů. Jakým způsobem to dělají? Jak se kvůli tomu obecně v ochranářství nazývají druhy organismů z minulé otázky?
5. I v případě, že je ochrana hmyzu zajištěna zákonem (jak tomu je ve většině zemí včetně té naší), nemusí to být žádná výhra. Často se totiž velmi vyzdvihuje ochrana jedinců, která v případě hmyzu je v naprosté většině případů bezvýznamná. Proč tomu tak je, když při ochraně např. velkých savců se tato strategie osvědčila? Jaký typ ochrany by se měl spíše uplatňovat a proč? Zkuste uvést a vysvětlit alespoň dva důvody, proč je těžké správnou ochranu hmyzu prosadit mezi běžnými lidmi.
6. Postoj veřejnosti a mnoha ochranářů často působí obrovské problémy lidem, kteří hmyz zkoumají, sbírají apod., přestože tito jsou jako hrozba pro ohrožené druhy naprosto zanedbatelní. Najděte jednu kauzu, kdy snaha o sběr a výzkum chráněného hmyzu způsobila problémy českým entomologům, a stručně ji popište. Poradíme, že dvě nejznámější se odehrály na Slovensku v roce 2004 a v Indii v roce 2008.
7. Na závěr zkuste přijít na faktory, které hmyz nejvíce ohrožují a na co by se tedy jejich ochrana měla také nejvíce zaměřit. Bohužel většina těchto faktorů je (hlavně z hlediska veřejnosti) těžko řešitelná a jejich řešení téměř neprůchozí. Napište alespoň tři konkrétní faktory, které hmyz výrazně ohrožují a uveďte, proč je tak těžké s nimi bojovat.

Úloha 3: Medvídkovití

Autor: Eliška Pšeničková

Počet bodů: 17

Vedle velkých a krvežíznivých šelem medvěďovitých obývají naši planetu i stvoření medvídkovitá, a tím nejsou míněni plyšový obyvatelé dětských pokojů.

1. Jaké jsou společné znaky zástupců v této čeledi?
2. Nakresli fylogenetický strom této čeledi, včetně všech známých druhů, uveďte odborná i česká jména. Celá čeleď má evoluční původ v Americe, vyznačte ve fylogenetickém stromu barevnými symboly, kde se každý druh vyskytuje. Rozlišujte barevnou škálou mírný a subtropický pás Severní Ameriky, Střední Ameriku, tropický, subtropický a mírný pás Jižní Ameriky
3. Jaký vliv na rozšíření čeledi měla „Velká americká výměna“?
4. Kteří zástupci se projevují denní aktivitou a kteří mají chápavý ocas?
5. Jmenujte největšího zástupce medvídkovitých.
6. Zjistěte, kde žije mýval trpasličí *Procyon pygmaeus*. Jaký je jeho stupeň ohrožení podle IUCN? Zjistěte, jaká evoluční změna u něho proběhla a jak se tento proces

nazývá v obecné ekologii.

7. Mýval severní *Procyon lotor* je naopak často nazýván škůdcem a bez problému se šíří i v lidské civilizaci. Zjistěte, kde byl jeho původní areál v Severní Americe před jeho ovlivněním člověkem.



8. Mývala můžeme potkat i u nás. Odkud se k nám přesně rozšířil a jak velká byla prvotní populace?
9. Jaký je starší název mývala?
10. S jakým jiným naším živočichem si můžeme mývala splést a do jaké čeledi tento organismus patří?
11. Kam byl mýval zavlečen v důsledku toho, že se objevoval v TV pořadu, který byl v té zemi velmi populární?
12. Mýval je v Severní Americe rezervoárem vztekliny. Popište a zdůvodněte, jak se v čase vyvíjí infikovanost populace a jaká je periodicitu infekčních vzplanutí.
13. Nejmysterioznějším zástupcem čeledi je bezesporu olinguito *Bassaricyon neblina*. Uveďte, kdy a jakým způsobem byl objeven?
14. Čím se vyznačuje člen nosála bělohubého *Nasua narica* a k čemu mu slouží?
15. Jaká adaptace zajišťuje vynikající pohyblivost u freta kočičího *Bassariscus astutus*?
16. Jak se jinak nazývá kynkažu *Potos flavus* a k čemu mu slouží dvacetimetrový jazyk?
17. Komu patří kynkažu jménem Baby Luv?
18. **Bonusová otázka:** Který zástupce z této čeledi se Ti nejvíce líbí?

Úloha 4 (praktická): Probouzení vegetace

Autor: Eliška Pšeničková

Počet bodů: 25

V této praktické úloze se opět zaměříme na fenologické pozorování, obdobně jako tomu bylo již v první sérii, kdy jsme pozorovali opad listů. Nyní končí dormance a začíná vegetační období. Přechod rostliny do období odpočinku a výstup z něj zajišťují fytohormony, jejichž dynamika je vázána na okolní podmínky. Na listnatých stromech z jara raší pupeny a brzy také drobné lístky, které rostou a rostou, až obalí celý strom. Zároveň se objevují květy, které se po opylení mění v létě v plody. Naše rostliny, tedy rostliny

mírného pásma, během roku projdou jedním fenologickým cyklem. Ale například v tropických oblastech může rostlina prodělat několik takových cyklů během jednoho roku. U nás můžeme pozorovat dva typy růstové aktivity. První typ spočívá v tom, že se nejprve prodlužují prýty časně zjara, poté na nějakou dobu růst ustává a obnovuje se ještě několikrát v průběhu vegetační sezony. Druhý typ má synchronizovaný růst s délkou dne, takže není v průběhu vegetační sezony přerušován.



1. U kterého stromu se nejprve objevují květy a teprve pak list? Napište alespoň tři příklady stromů z různých čeledí.
2. Jak se jmenuje první a druhý typ růstové aktivity popisované v textu? Uveďte i s příkladem rostliny daného typu.
3. Nyní budeme pozorovat rašení pupenů a celkové probouzení vegetace. Vyberete si 2 stromy stejného druhu. U každého si označíte (například bavlnkou, ale neutahujte jí příliš těsně!) 3 pupeny (každý pupen na jiné větvi). Pupen je potřeba začít sledovat ještě v období dormance. Jakmile se začne zvětšovat, budete zapisovat jeho přírůstek. Bylo by nejvhodnější provádět měření každý den, každopádně lze ho provádět v pravidelné frekvenci každý 2. - 4. den. Přírůstky nebudou příliš skokové. Pozorujeme čtyři fáze: pupen v dormanci, pupen nabobtnávající, pupen rašící (po objevení špičky prvního listu) a pupen co opadl nebo byl ulomen. Jakmile se objeví první lístek, začnete měřit jeho velikost. Zde už měřte pokud možno každý den. Délka listu se měří od báze čepele po její vrchol. Měření délky listu ukončíte, jakmile naměříte po 3 měřeních stejnou hodnotu (nebo se bude blížit uzávěrka série). Data zpracujte do přehledných tabulek, grafů. Porovnejte oba stromy. Do protokolu přiložte pár fotek z měření. Protokol zpracujte dle

<http://www.studiumbiologie.cz/biozvest/navody.html#TOC-Vzorov-protokol-praktick-lohy>

Pokud už nestihnete pupeny zcela v dormanci, nezoufejte. Počasí se ne vždy chová tak, jak se od něj v jeho roční dobu očekává. Snažte se proto úlohu vypracovat co nejdříve. (Každopádně nespolehejte na fakt, že se při hodnocení spokojím s pozorováním, které bude probíhat jen velmi krátkou dobu.) Pokud u Vás probíhá rašení velmi časné, soustřeďte se na pozdně rašící druhy, například ořešák.

V alternativním případě můžete pozorovat šefík *Syringa*. Budete pozorovat celkem 5 fází. Fáze první je ta, kdy se objeví první listy. Do druhé fáze se dostáváme tehdy, když je šefík plně olistěný a vyrašily téměř všechny pupeny. Fáze třetí přináší první květy, poznáme jí tak, že alespoň polovina hroznů má otevřený alespoň jeden květ. Čtvrtá fáze nese

označení jako plnokvětá, zde jsou téměř všechny květy otevřeny. Pátá fáze nastává při odkvětu téměř celého keře. Pozorování je třeba provádět každý den. Sledování by mělo probíhat od časného jara do odkvětu šeríku. Vždy pečlivě zaznamenejte výchozí stav pozorování. Data vyhodnoťte. Do protokolu a přiložte pár fotek z průběhu pozorování.

4. Jmenujte alespoň 5 faktorů, které ovlivňují rašení rostlin.
5. Co je to suma efektivních teplot (GDS) a potenciální evapotranspirace (PET)?
6. U dřevin chrání vyvíjející se základy mladých větví (pupeny) pupenové šupiny listového původu. Urči, jaký pupen má:
 - a) vrba jívá
 - b) bez hroznatý
 - c) buk lesní
 - d) kalina tušalaj
7. Někdy jsou pupeny či mladé listy chráněny lepkavými sekrety. Pro koho je to typické?
8. U koho je pupen chráněn i rozšířenou spodinou listového řapíku?

Úloha 5: Hodnocení sérologického nálezu

Autoři: Kristýna Minářová, Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 20

Letošní seriál začal popisem metod, sekvenování. Pak jsme se setkali s nejmodernějšími přístupy, které umožňují masivní, rychlou a levnou sekvenaci jakéhokoliv materiálu a ukázali jsme si, že se s úspěchem dá sekvenace použít při popisu mikrobiálního společenstva. Jedním velkým mikrobiálním společenstvem je ale i člověk, a zvláště ten nemocný. V posledním dílu seriálu si přiblížíme, jak se k identifikaci členů mikrobiální komunity přistupuje v medicínské praxi. Za jak dlouho nastane doba, kdy bude sekvenační přístroj v každé ordinaci vesnického lékaře? Ale je to vůbec potřeba? To se dozvíte v následujícím textu.

Zjištění původce nemoci je samotným základem diagnózy, protože nám to umožní nasadit patřičnou léčbu a vyhneme se takovým excesům, jako je nasazení antibiotik (které působí výlučně na bakteriální patogeny) v případě virové infekce...

Lékař pátrá po původci nemoci stejně jako kriminalista po pachateli trestného činu a má k dispozici nespočet metod. Používá buď metody přímé, kdy nalézá části „těla“ daného původce, nebo nepřímé, kdy nalézá „stopy“, které za sebou daný původce zanechal. Je jedno, jestli se jedná o několik mikrometrů velkého *Streptokoka*, nebo 14 metrů velkou tasemnici. Jen metody průkazu se liší. Tou nejstarší metodou průkazu je **přímé pozorování**. Jedná se postižení různými ektoparazity. Nicméně stejně dobře lze pozorovat nárůst bakteriální vegetace v zavedeném močovém katetru, nebo, tentokrát již s použitím ultrazvuku, lze pozorovat nárůst bakteriálních vegetací na srdečních chlopních při infekční endokarditidě.

Další, již o něco mladší metodou, je **přímá mikroskopie**. Prvním pozorovaným mikroorganismem byla *Giardia Lamblia* ve stolici otce mikroskopu, Antona van Leeuwenhoeka. Dodnes se přímá mikroskopie používá při rutinním vyšetření jakéhokoli biologického materiálu. Důvodem není ani tak identifikace patogenu, jako spíše určit kvantitu mikroorganismu v daném vzorku před tím,

než bude provedena jeho kultivace. K diagnostice se přímá mikroskopie používá v případě patogenů, které se v laboratorních podmínkách nemnoží, nebo se množí velmi pomalu. Typickým případem je Ziehl-Neelsonovo barvení k průkazu mykobakterií, především tuberkulósy. Jako jediná metoda je používána přímá mikroskopie při průkazu střevních parazitů, nebo některých jednobuněčných parazitů, jako jsou *Plasmodia*, *Leishmania*, *Trypanosoma* atd..

Jednou z nejběžnějších a zároveň nejjednodušších metod je **kultivace v médiu**. Používá se rutinně k průkazu bakterií. Odebraný biologický materiál se aplikuje do media, ve kterém se bakterie pomnoží, a následně se identifikuje. Díky umístění antibiotických terčů lze dokonce zjistit citlivost k antibiotikům a nasadit cílenou léčbu. Její velkou nevýhodou je doba trvání. Zatímco výsledek přímé mikroskopie získat prakticky ihned, pokud máte dobré vztahy s parazitologem, který ji provádí, kultivaci v mediu urychlit nelze a na výsledek se minimálně 3 dny musí čekat, což pro člověka v septickém stavu (s akutní infekcí) není ideální řešení. Dalším problémem je, že člověk není sterilní epitop. Je domovem pro řadu běžných bakterií, které vytváří běžnou floru na sliznicích a kůži, které ovšem v laboratorních podmínkách mohou „přerůst“ námi hledané patogeny. Zároveň se žádné bakterii nedaří na umělém mediu tak dobře jako v hostiteli. A tak i když kultivujeme materiál, který by měl být za normálních podmínek sterilní, velmi často se neshledáme s úspěchem. Velmi citlivé k zevnímu prostředí jsou tzv. hemokultury. Jedná se o nádoby s tekutým kultivačním médiem, ve kterém se kultivuje vzorek krve. Krev je za normálních podmínek sterilní, ale i při těžké sepsi je množství bakterií v oběhu tak malé, že se podaří původce kultivovat velmi zřídka. Nicméně to není důvod se o to alespoň nepokusit, protože pokud se nasadí antibiotika „naslepo“, bez odběru biologického materiálu, a původce k nim není citlivý, šance, že se podaří z pozdějších kultivací získat původce, je minimální. Dalším problémem je vlastní hodnocení získaných kultivací. Vždy záleží odkud, co a kolik kultivujeme. Například se říká, že jedna pozitivní hemokultura nic neznamena, protože je kontaminovaná a dostaly se do ní bakterie z kůže. Měly by se nabírat tedy alespoň 3 hemokultury. Ovšem hodnocení kontaminace není tak jednoduché – pokud bude laboratorista hlásit, že ve třech hemokulturách (a třeba i v kultivacích z dalších tekutin získaných drainováním zánětlivého ložiska) byla nalezena bakterie, která běžně osídluje kůži, jedná se zřejmě o původce sepse. Pokud ale ze 3 hemokultur bude pozitivní jen jedna, ale bude v ní bakterie osídľující běžně nikoliv kůži, ale střevo a navíc stejná bakterie bude přítomna v moči a pacient bude mít prokazatelně močovou infekci, pak se jedná nejspíš o původce sepse, který vychází z močových cest. A potvrzuje se pouze skutečnost, že koncentrace bakterií v krvi a úspěšnost kultivace nemusí být příliš vysoká.

Dále je třeba hodnotit počet bakteriálních druhů. Je logické, že ze stěru z kůže, přesněji z poranění na kůži, vyrostou velké množství druhů bakterií osídľujících kůži. Nicméně i tak se může stát, že některé z nich jsou zodpovědné za infekci rány. Pokud ale podobné množství druhů bakterií bude přítomno v moči (která je primárně sterilní a v případě infekce by měl dominovat jediný či několik málo druhů

bakterií) jedná se s největší pravděpodobností o kontaminaci, která většinou pochází ze střevní nebo kožní mikroflóry. Prokážeme to mikroskopickou analýzou močového sedimentu získaného centrifugací, který odhalí či vyloučí přítomnost bakterií. Obecně se dá říci, že infekce močových cest kožními bakteriemi jsou poměrně vzácné. Naopak střevní bakterie jsou nejčastějšími příčinami močových infekcí.

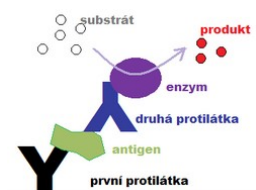
Další problém bývá s hodnocením materiálu získaného ze sputa. Sputum je hlen vykašlaný z dolních cest dýchacích, tedy průdušek a plic, které jsou primárně sterilní, a dá se tedy předpokládat, že to, co pacient vykašle, to tam nemá co dělat. Kámen úrazu spočívá v tom, že vykašlaný materiál musí projít ústní dutinou... Staré mikrobiologické pravidlo říká, že „sputum obsahuje vše od alveolů plicních po alveoly zubní“. Tedy od plicních sklípků po zubní lůžka. Velkou zradou je přítomnost některých oportunních patogenů v horních dýchacích cestách, které jsou za normálních okolností zcela neškodné, ale v případě opouzdření mohou být nebezpečnými patogeny. Mezi nejdůležitější patří trojice: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Neisseria meningitidis* (pokud jste se s jejich jmény prozatím nesetkali, najděte si na internetu, s kým máme tu čest). Jediným způsobem, jak získat nekontaminovaný materiál z dýchacích cest je provést bronchoalveolární laváž. Pacientovi se zavede bronchoskop do jednotlivých průdušek a propláchnou se fyziologickým roztokem. Poté se roztok odsaje. Samozřejmě se proces provádí postupně, aby se pacient neutopil. Fyziologický roztok je izotonický s plasmou a vstřebá se do krve, díky tomu nedojde k poškození plic.

Samostatnou kapitolou hodnocení je kultivační nález v krku. Různé zdroje uvádějí různé informace, ale v podstatě jediným patogenem, kterým má smysl se zabývat ve výtěru z krku, je *Streptococcus pyogenes*, který je pro svou schopnost lyzovat erytrocyty na krevním agaru zvaný Beta-hemolytický streptokok. V krku vyvolává tonsilitidu (angínu nebo spálu) a je vždy patogen. Tím se liší zlatého stafylokok *Staphylococcus aureus*, který může být v dutině ústní pouze jako komenzál. Velmi často je projevuje jako tzv. bakteriální superinfekce (tedy druhotná infekce napadající již infikovanou tkáň) různých kožních poškození či virových onemocnění kůže a dýchacích cest.

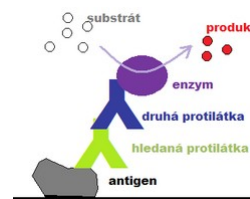
Zcela odlišnou problematikou jsou výtěry z uší. Velmi často se udává za příčinu infekce středouší *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* nebo *Pseudomonas aeruginosa*. Ale fakt je, že velmi často je za zánětem středouší právě *Streptococcus pyogenes*, který do uší migroval přes Eustachovu trubici. Háček je v tom, že se málokdy podaří v uších zachytit, protože do středního ucha se při výtěru nedostaneme. Napomoci při hledání původce a tím i odpovídající léčby nám může napomoci anamnéza, kdy nemoci předchází angína u pacienta či blízkého člověka.

Doposud jsme se zabývali identifikací bakterií. Mnohem obtížnější je **prokazování virových původců** nemoci. Existuje dokonce přímá metoda pro pozorování virů. Jedná se o inokulaci viru do kuřecího embrya a následně pozorování v elektronovém mikroskopu. V klinické praxi se ale neprovádí pro vysokou technickou náročnost a ekonomické náklady. Z nejnovějších metod, které se při laboratorní diagnostice průkazu patogenů používají, je

průkaz antigenu daného patogenu pomocí **komplement-fixační reakce**, **hemaglutinačním testem** nebo **ELISA testem**. Takto se prokazují antigeny jednak virů, jednak bakterií – ve stolici *Clostridium difficile*, v moči pak *Legionella pneumophila* a *Streptococcus pneumoniae*. Principem všech těchto metod je interakce protilátek s antigeny, tedy s proteiny patogenů. Pokud chceme u pacienta prokázat například přítomnost viru v krvi, potřebujeme specifickou protilátku, která interaguje s určitým povrchovým proteinem virové částice. Protilátky se dnes dodávají průmyslově a izolují se z tkáňových kultur lymfocytů, které pochází z infikovaného organismu, nejčastěji myši. Protilátky si můžeme připravit i naprosto jednoduše tak, že zvířeti vneseme do krve zkoumaný protein a po nějaké době mu odebereme krev, v níž bude nyní mezi obrovským množstvím různých protilátek i frakce těch, které výlučně rozeznávají náš protein a zvíře je vytvořilo za účelem odstranění cizorodé látky z těla. Při provádění imunodetekčního testu v případě **ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay) postupujeme tak, že ke specifické protilátce, která je pevně navázána v testovací komůrce na plastové destičce, nakapeme vzorek od pacienta, načež se antigenní proteiny ze vzorku vážou na zakotvenou protilátku. Potom místo vzorku přidáme do jamky detekční roztok, který obsahuje taktéž protilátku proti antigennímu proteinu, ale tentokrát volně rozpuštěnou v roztoku a navíc modifikovanou tak, že je k ní připojen nějaký enzym (například peroxidáza). Nově přidaná protilátka se taktéž váže s antigenem, který je nyní pevně zakotven k první protilátce na dně jamky a to způsobí zachycení i značené protilátky v jamce. Nakonec se roztok protilátky nahradí roztokem látky, která poskytuje výraznou chemickou reakci s enzymem na druhé protilátce. Například peroxidáza katalyzuje tvorbu luminiscenčního záření, pokud k ní přidáme peroxid a luminol.



Test ELISA lze provádět i v uspořádání, kdy na destičce není zachycena protilátka proti antigenu z patogena, ale antigenní protein je zachycen přímo na destičce. Potom testem ze vzorku krve naopak vychytáváme specifické protilátky, které organismus vytvořil proti antigennímu proteinu a je to obrácený důkaz infekce, který lze použít v případech, kdy je volných patogenních částic v krvi velmi málo, a nebo pokud chceme prokázat dávné setkání pacienta s patogenem, které se projeví pouze přítomností specifických protilátek. Zachycená protilátka se detekuje nikoliv protilátkou proti antigenu, ale specifickou protilátkou, která rozeznává daný typ protilátky (pokud třeba do myši vneseme lidskou protilátku, vytvoří myš sadu protilátek, které rozeznávají lidské protilátky od myších a umožní je odstranit je z krve. Použitelná je samozřejmě jen taková myši protilátka, která rozeznává tu část lidské protilátky, která není variabilní).



Průkaz antigenu je obecně přijímaný jako přesný a spolehlivý marker detekce patogenů. Ale i zde je třeba se mít na pozoru. Všechny laboratorní metody jsou pouze pomocné a nakonec je třeba stejně použít zdravý rozum. Dnes jsou pro průkaz různých patogenů používány různé sériově vyráběné kity (kitem se v experimentální biologii rozumí krabička, kde jsou přichystány v různých barevných lahvičkách všechny roztoky a jiné potřeby pro provedení daného pokusu včetně obrázkového návodu, aby to zvládl provést i naprostý analfabet). Možným rizikem imunodetekčních analýz je zkřížená reaktivita protilátek s jinými antigeny, což způsobuje falešně pozitivní výsledek. Proto je třeba mít se na pozoru, pokud laboratoř hlásí více než jeden pozitivní výsledek.

Nejmodernějším průkazem využitelným zejména na virové infekce je pak průkaz nukleových kyselin pomocí **PCR** (polymerázové řetězové reakce). Z biologického vzorku v tomto případě izolujeme DNA a testujeme, zda-li po přidání primerů, krátkých DNA úseků komplementárních k sekvenci, která je specifická pro cizorodou DNA patogena, se nastartuje po přidání DNA polymerázy replikace DNA. Pokud po PCR získáme produkt replikace DNA, je to důkaz přítomnosti konkrétního úseku DNA patogena. V medicíně je ovšem s průkazem pomocí PCR drobná potíž. Je to podobné, jako když obdržíte zásilku s useknutým prstem – vy nevíte, jestli je z mrtvol, nebo zda daný člověk ještě žije. PCR říká pouze to, že se v daném materiálu vyskytuje nukleová kyselina daného patogena. Vy tedy nevíte, jestli je člověk opravdu nemocný, nebo zda v něm pouze přetrvává daná nukleová kyselina, která je pozůstatkem rozpadlých hostitelských buněk. Dalším problémem detekce virů je, že po počátečním masivním množení virů přechází infekce do fáze, kdy se viry zabudované v buňkách množí velmi pomalu a jejich detekovatelnost rychle klesá s časem.

Přímé vyšetřovací metody jsou většinou mimořádně přesné a pozitivní nález většinou znamená záchyt původce. Nicméně jsou situace, kdy přímý průkaz není možný, ať už technicky nebo, většinou, finančně (například medicínská PCR stojí řádově tisíce korun a to i přesto, že reálná cena vlastního provedení reakce – pokud ji děláme neakreditovaně jako biolog – je asi 10 Kč). Proto se uchylujeme k nepřímým průkazům. Může se jednat opět o přímé pozorování, nejčastěji na kůži. Takto můžeme pozorovat chodbičky po zákožce svrabové, která je zodpovědná za svrab, nebo poštipání různým hmyzem. Nejčastěji se ale jedná o tzv. **sérologii**. Sérologie je obecný termín, kterým se označuje průkaz protilátek, který jsme popisovali již jako jednu z variant testu ELISA. Prokazují se tak především viry nebo bakterie, které lze kultivovat jen obtížně nebo vůbec. Jedná se o chlamydie, rickettsie, spirochéty a intracelulární bakterie jako jsou *Francisella tularensis*. Dále se tak dají zjišťovat parazité (v lékařské terminologii je tím myšleno všechno, co není virus, bakterie nebo houba, taxonomové nechť nám odpustí) jako je *Toxoplasma gondi* nebo tkáňové helminty způsobené

motolicemi a jinými parazity. Obvykle se jedná o průkaz protilátek v krevním séru, ale ne nutně. Například rutinně se protilátky vyšetřují i v mozkomíšni moku, dále punktátech (vzorky tkáňového moku z infikovaného místa) z kloubů nebo plášťových dutin jako je pohrudniční výpotek a výpotek v osrdečníku. Při hodnocení sérologie je třeba si uvědomit, k jakým procesům v těle dochází, jaká je dynamika tvorby protilátek a že možnosti sériově vyráběných kitů jsou omezené. Stejně tak pacienti mohou mít z nejrůznějších důvodů patologické protilátky, které komerční kity nedokážou rozlišit. To, že výsledky vychází ve veličinách pozitivní/ negativní ještě neznamená, že pacient danou chorobu má. Na začátek si objasníme, jaké druhy protilátek nás vlastně zajímají. V krvi máme 5 základních tříd protilátek (Ig, tj. imunoglobulin A, D, E, G a M). Při hodnocení sérologie nás zajímají většinou jen dva druhy – **IgM** a **IgG**. Existují onemocnění, která jsou vázaná na sliznice, potom nás zajímá ještě **IgA**. Základní předpoklad pro správné hodnocení sérologie je znalost dynamiky tvorby protilátek. Jedná se o produkt B-lymfocytů, které se ovšem začínají tvořit nejdříve 3 dny po nakažení. Teprve za týden od nákazy jsou detekovatelné protilátky třídy IgM. Jinými slovy, týden nelze sérologicky zjistit, že se něco děje. Tomuto období se říká diagnostické okno a jediný způsob, jak diagnostikovat dané onemocnění je PCR (či kultivační metody, pokud jsou použitelné). Při běžném provozu to příliš nevádí, ale velkým problémem je diagnostické okno na transfusních stanicích, kde je třeba vědět, zda dárce není osoba infikovaná přenosnou chorobou. Po této době se začínají tvořit protilátky IgG. Detekovatelné jsou asi po 14 dnech od nákazy, maximum produkce mají asi za 3 týdny od infekce. V horizontu týdnů, u některých chorob až měsíců, klesají IgM protilátky a přetrvávají IgG protilátky. Ty mohou přetrvávat dlouhodobě až doživotně a vytvářet tak dlouhodobou imunitu před další infekcí tím samým patogenem. Pokud jsou v sérologii přítomny pouze IgG protilátky, nazýváme je anamnestickými, tedy paměťovými, po již prodělaném onemocnění. Tudiž se nejedná o akutní onemocnění.

Dále je třeba něco vědět o specifitě daných testů. Většina onemocnění se testuje pomocí ELISA testu, což pro hrubou orientaci u většiny onemocnění stačí. Velmi často ovšem dochází k tzv. nespecifické reaktivitě nebo k tzv. zkřížené pozitivitě. V případě nespecifické positivity se jedná o pozitivní nálezy, i když dotýčný pacient dané onemocnění nemá. Typicky se vyskytují ve třídě IgM, i když se bohužel dají potkat i v IgG. Zkřížená pozitivita znamená, že pacient má jiné onemocnění, které se vyznačuje tvorbou protilátek, které interferují s komerčně vyráběným kitem. Typicky se nespecifické protilátky nacházejí u lidí, kteří mají nějaké známé autoimunitní onemocnění, a tvoří nejrůznější patologické protilátky, které reagují s každým absorbentem, na který se dostanou. Termín zkřížená pozitivita se používá v případech, kdy se jeden vzorek vyšetřuje na několik různých onemocnění, přičemž jedno onemocnění vyjde jednoznačně pozitivní a ta ostatní jsou sice pozitivní, ale v nižší koncentraci. Vzhledem k tomu, že hodnocení v laboratorii píše stroj, vždy označí pozitivní IgM protilátky jako akutně probíhající onemocnění. Naštěstí ve většině případů lze velmi snadno poznat, odkud vítr fouká. Na nespecifickou reaktivitu upozorňuje fakt, že onemocnění probíhá již několik týdnů a přitom má pacient v sérologii

pouze IgM protilátky. Občas ovšem zradí i testy, na které bylo celkem spolehnouti, a v sérologii se objeví pozitivita IgM i IgG. Definitivní rozhodnutí vydá až avidita. Avidita je „přílnavost“ protilátek IgG k antigenu. Vytvářené protilátky totiž tělo neustále zdokonaluje a protilátky vytvářené dříve po infekci vykazují pevnější vazbu na antigen (tedy vyšší aviditu). Jinými slovy, čím vyšší avidita, tím spíše se jedná pouze o anamnestické protilátky a o onemocnění se již nejedná. K identifikaci akutní infekce nám může ještě pomoci párové sérum. Používá se nejčastěji u zkřížené positivity. Odběr zopakujeme s odstupem 2-3 týdnů a výsledky se porovnájí. V případě probíhající infekce by mělo dojít k nějakému vývoji, přesněji řečeno k poklesu až vymizení IgM a výraznému vzestupu, nebo naopak úplnému vymizení IgG.



Samostatnou problematiku tvoří neuroinfekce. Nikde totiž není psáno, že když má pacient protilátky v krvi, musí nutně probíhat infekce mozku. Mozek je totiž chráněn hematoencefalickou bariérou, která ho brání před infekcí. Definitivní stanovení zánětu mozkových blan je vyšetření mozkomíšního moku. Jednak jeho biochemického a cytologického složení, jednak sérologie a u hnisavých zánětů mozkových blan také kultivace. Z logiky věci vyplývá, že při normálním biochemickém a cytologickém nálezu je pravděpodobnost infekce minimální. Sérologie z mozkomíšního moku naštěstí vycházejí poměrně relevantně, takže falešná pozitivita je opravdu výjimečná, i když také se stane, především při autoimunitním onemocnění mozku, např. při roztroušené sklerose. Systém hodnocení výsledků je stejný, jako z krve.

Toto bylo obecné schéma při hodnocení sérologie. Dále existují určitá specifická onemocnění, při kterých se vyskytují pro dané onemocnění specifické protilátky a antigeny, které je třeba zohlednit. Jedná se o hepatitidu B, infekční mononukleosu EBV a dále je problém při sérologickém hodnocení toxoplasmosy, chlamydií a lymfské borreliosisy. A konečně, při hodnocení hepatitidy C se nelze o serologii opírat a je nutné ji verifikovat pomocí PCR. Nejnáročnější na zhodnocení je **virová hepatitida B**. Naštěstí výsledky, které vychází z laboratoře, jsou většinou směrodatné a při správné interpretaci lze opravdu říci, zda dotýčný pacient má formu akutní, chronickou či exacerbaci (nové vzplanutí) chronické formy, a nebo ji už prodělal a už ji nemá. A nebo zda byl pouze očkován. Celkem se používá 6 markerů: přítomnost vlastních virových proteinů – **antigeny HBs** a **HBe**, protilátky proti antigenům – **anti-HBs**, **anti-HBe** (samotný HBe antigen je v krvi technicky nedetekovatelný) a **anti-HBc**, a **anti-HBc total** („total“

znamená IgM+ IgG, v případě anti-HBc se detekují pouze IgM). Virus hepatitidy B (VHB) je DNA virus, který má nukleovou kyselinu obalenou kapsulárním antigenem (HBc, tj. „capsular“), proti kterému se tvoří protilátky (anti-HBc IgM a IgG). V případě již prodělané a nepřetrvávající infekce jsou z anti-HBc detekovatelné pouze anti-HBc total díky přítomnosti paměťových IgG protilátek. V případě, že se jedná o exacerbaci chronické infekce, roste k tomu ještě podíl IgM protilátek. Množení viru bývá doprovázeno produkcí HBe antigenu (tzv. časný „early“ antigen). Je jedním z prvních, který je detekovatelný při probíhající onemocnění. V případě, že dochází k ústupu infekce, detekujeme naopak protilátku proti HBe antigenu, anti-HBe. A nakonec je tu HBs antigen, tzv. australský antigen. Jedná se o povrchový antigen z obalu viru („surface“). Proti němu se tvoří protilátka anti-HBs. Jedná se o nejdůležitější marker u virové hepatitidy B. V případě, že má pacient pozitivní australský antigen, tak má nějakou formu virové hepatitidy B. V případě že je negativní, tak virovou hepatitidu B nemá. Jistě vás napadne, že podobně by se dal používat HBe antigen. Problém je v tom, že přestože virus velmi často časný antigen tvoří, tak jeho výskyt není stoprocentní. Zatímco bez HBs antigenu nemůže virus přežít. Detekce HBs antigenu v plasmě je stejně časná jako v případě HBe antigenu. Proto při screeningu virových hepatitid se jako první testuje HBs antigen a když je negativní, pacient hepatitidu B prostě nemá. V případě vyléčení pacienta dochází k tomu, že klesá australský antigen a roste jeho protilátka anti-HBs. Díky tomu se dá sledovat dynamika onemocnění. U uzdraveného pacienta přetrvává anti-HBs, ale také anti-HBc total a v případě předchozí produkce HBe antigenu také anti-HBe. Při očkování, se tělo imunizuje HBs antigenem, proti kterému jsou během pár týdnů vytvořeny anti-HBs protilátky, které jsou po zbytek života detekovatelné v krvi, ale ostatní parametry jsou negativní. Dalším, již o něco méně složitějším, ale o to běžnějším onemocněním, je **infekční mononukleosa**. Při infekci virem EBV se řeší 4 parametry: **VCA IgM**, **VCA IgG** (VCA je kapsidový antigen, proti kterému se tvoří dle standardního schématu IgM a IgG protilátky), a dále přítomnost antigenů **EBNA** a **EA**. EA je časný antigen, který je tvořen první 2-3 měsíce po infekci. EBNA je 6 nukleárních antigenů, které se tvoří až během rekonvalescence a které perzistují v těle po celý život. To znamená, že pokud je detekovaná EBNA, tak pacient infekční mononukleosu nemá. A to dokonce ani tehdy, když se v laboratoři prokáže pozitivita VCA IgM. Pokud se takový serologický nález najde, znamená to, že jde buď o zkříženou pozitivitu, nebo takzvanou reaktivaci. Virem EBV se nakazí většina lidí během dospívání, nicméně promořenost populace nad 40 let se limitně blíží 100%, přičemž pouze u malého množství lidí probíhala infekce obrazem infekční mononukleosy. Podotýkáme, že reaktive viru je obvykle nemá, čili pacient nemá žádné potíže a pouze infikuje vnímavé jedince (většinou svoje děti). Samozřejmě, i zde existuje jistý prostor pro spekulace. Existuje určitá část populace (asi 2%), která netvoří EBNA. Když u nich dojde k reaktivaci, nebo zkřížené pozitivitě IgM protilátek, jedná se o diagnostický oříšek, neboť se onemocnění jeví jako akutní infekce. I zde se dá za pomoci vlastní hlavy poznat, že nejde o akutní onemocnění, ale vyžaduje to velkou dávku umění a ještě větší množství

diplomacie, protože pacienti obvykle přichází od praktického lékaře informováni, že mají mononukleosu. Přitom jejich jediný problém je únava a v ruce mají papír s tímhle nálezem. Obvykle jsou na mononukleosu „moc staří“ (jsou to většinou třicátníci až čtyřicátníci, takže žádní starci, ale přece jen, pubertu už mají za sebou ☺) V ostatní laboratoři nemají obraz typický pro infekční mononukleosu – mají normální jaterní testy, v krevním obraze nejsou žádné atypické lymfocyty. V serologii je užitečnou pomůckou, že VCA IgM je sice pozitivní, ale jen na slabě (při akutním onemocnění obvykle na tři až čtyři křížky), zatímco bývá silně pozitivní IgG (při akutním infektu je sice pozitivní, ale obvykle maximálně na dva křížky).

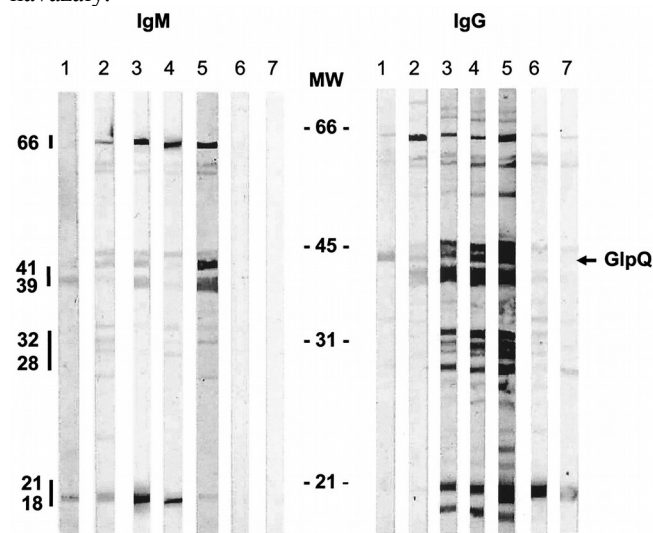
Dalšími specifickými onemocněními, při kterých je nutné zvažovat ještě protilátky třídy IgA, jsou chlamydiové infekce a toxoplasmosa. Chlamydie jsou zodpovědné za zápaly plic, za močové infekce, záněty kloubů a v tropech za infekce očí. Nicméně v současné době se především v laické veřejnosti rozmáhá názor, že v podstatě za jakékoli nespecifické příznaky mohou právě chlamydie (nebo borrelie, ale o těch až později). Jedná se spíše o životní styl, který je bohužel podporován dokonce některými lékaři, kteří spíše než na blaho svých pacientů, hledí na své konto. V současné společnosti totiž na jednu stranu pacienti odmítají dopláct pár set korun za odlehčenou sádku, ale na druhou stranu neváhají vyhodit tisíce za šarlatánská vyšetření a ještě zbytečné léky (zejména antibiotika), které je dokonce v mnoha případech poškozují. Jedna z věcí, které tak dokonale nahrávají nechutnému byznysu kolem chlamydií (a ještě více kolem borelií) je poměrně nevýtečná serologie. Při akutní infekci samozřejmě vznikají IgM protilátky, jejichž test je ale celkem nespecifický a dochází ke zkřížené reaktivitě v případě téměř jakékoli infekce. Proto je třeba mít pozitivní i IgA protilátky, které se vyskytují na sliznicích. IgG protilátky pak přetrvávají řadu měsíců. V případě tohoto nálezu, a zároveň při přítomnosti adekvátního klinického obrazu, lze říci, že dotyčný má chlamydiovou infekci. Vzhledem k výrazné zkřížené pozitivitě se dnes při podezření na chlamydiovou infekci obvykle provádí detekce pomocí PCR, ať už z moči, spojivkového vaku, kloubního punktátu nebo ze sputa či nosohltanu.

Podobný problém nastává při hodnocení toxoplasmosy. Toxoplasmosa je onemocnění způsobené mikroorganismem *Toxoplasma gondi*, kterého, podobně jako virus mononukleosy, přenáší velká část populace. Ve svém akutním stavu vyvolává záněty uzlin, záněty očí, horečku a může být spojena s encefalopatií- pacienti jsou neklidní, roztřesení a mohou být i agresivní. Obvykle ale akutní forma odezní spontánně bez následků a běžně se neléčí. Jedinou výjimkou jsou těhotné ženy, protože toxoplasmosa vyvolává těžké postižení plodu a může být dokonce indikován potrat. I zde je ovšem sérologicky šedá zóna. Při akutní toxoplasmose jsou pozitivní IgM a IgA protilátky, které jsou často nespecifické (mohou se vyskytnout i při jiném onemocnění). Problém je v tom, že velká část populace má anamnestické protilátky IgG, takže pokud dojde k nespecifické reaktivaci IgM nebo IgA, nemusí být rozeznáno, že nejde o akutní onemocnění. Vzhledem k tomu, že máme v rukou rozhodnutí o tom, zda pacientku vyslat či nevysslat k interrupci, jedná se o závažné rozhodnutí, u kterého je třeba mít jistotu. V případě

pozitivity pouze IgM, bez IgA je velmi pravděpodobné, že se jedná pouze o nespecifickou reaktivaci, ale vyloučit akutní onemocnění nelze. Proto je třeba vždy testovat aviditu protilátek, která rozhodne.

A konečně, onemocnění, které dokáže udělat z infekční ambulance osmý kruh Dantova Pekla- Lymeská borreliosa. Jedná se o bakteriální onemocnění, které je vyvolané spirochétou *Borrelia burgdorferi*. V České republice se vyskytují převážně dva poddruhy *B.b. afzeli* a *B.b. garinii*. Onemocnění probíhá ve třech stádiích. Během prvního stadia se infekce projeví jako výrazné kruhové zarudnutí, které se označuje jako erytema migrans chronicum. Je velmi charakteristické svým tvarem. Většinou se jedná o soustředné kružnice. V dalším průběhu může dojít k infekci mozku nebo kloubů. Vzácnější formou je borreliový granulom na kůži nebo myokarditida – zánět srdečního svalu. Neuroborreliosa se projevuje jako jakákoli jiná forma neuroinfekce – bolesti hlavy, závratě, zvracení, světloplachost. Zánět kloubů se projeví jako aseptická artritida – kloub oteče, zarudne, vytvoří se výpotek, který se punktuje. Nejčastěji je postiženo rameno. Ve třetím stadiu již borrelie v těle přítomny nejsou a všechny změny, které nastanou, jsou způsobené autoimunním zánětem, který byl nastartován neléčenou borreliou. Jedná se o atrofii mozku, svalů a kůže, pacient může zemřít na srdeční arytmiie. Borreliosa není vzácné onemocnění, pro představu, během vrcholu sezony, což je zhruba od června do září, přijdou každý týden na infekční ambulanci 3-4 pacienti s borreliou ve stadiu erytema migrans. V té době zhruba jednou týdně přijde jeden až dva pacienti s neuroinfekcí. Většinou se jedná o klišťovou meningoencefalitidu, ale borreliová etiologie je prokázána přibližně 2x do měsíce. Nicméně i přesto, většinu pacientů s „borreliou“ tvoří lidé, kteří přicházejí od praktického lékaře s různými nespecifickými potížemi trvajícími řadu měsíců až let a s pozitivním výsledkem serologie v ruce. Navzdory tomu je až s podivem, jak je terciální stadium borreliosis vzácné... Proč je tedy borreliosa, přesněji řečeno její hodnocení, takový problém? Již výše jsme popsali, že u většiny onemocnění se hodnotí 2 druhy protilátek, a i u těchto relativně jednoduchých výsledků občas může vzniknout problém s jejich hodnocením. Co teprve když se vyšetřují protilátky proti asi dvaceti různým antigenům, které se vyšetřují u borreliosis! V okamžiku, kdy jeden z nich vyjde pozitivní, počítač test vyhodnotí v lepším případě jako „hraniční pozitivitu“, v horším napíše „pozitivní“. Dalším problémem je, že ostatní onemocnění se vyšetřují pomocí ELISA testu a většinou to k validnímu vyhodnocení stačí. U lymeské borreliosis protilátky tak často interferují s běžnými proteiny plasmy, takže samotný ELISA test je naprosto k ničemu a je třeba doplnit jej o **Western blot**. Ten využívá stejného principu, jako ELISA, kdy pátráme po přítomnosti specifických protilátek proti antigenům patogena v krvi, ale imunodetekční proces se neprovádí v jediné komůrce s navázaným antigenem, ale provádí se na proužku, kde jsou pomocí elektroforézy rozděleny jednotlivé antigenní proteiny borrelie. Proužek poté smícháme se vzorkem séra, a pokud v séru byly přítomny specifické protilátky proti proteinům borrelie, identifikujeme jejich vazbu na určitý protein na testovacím proužku. Oproti ELISA testu tedy naráz otestujeme přítomnost protilátek proti velkému množství borreliových antigenů. Zároveň vidíme, zda-li v

našem testu vycházejí jen nespecifické interakce (protilátky proti jiným bakteriím, které jsou podobné), či identifikujeme přítomnost velice specifických protilátek. Příklad Western blotu ukazuje obrázek, kdy vidíte, že ve vzorcích 1-7 jsou detekovány odlišné proužky. Také vidíte, že jsou zde identifikovány jak IgM, tak IgG protilátky. To se provádí stejně jako při testu ELISA – potom co necháme protilátky ze séra interagovat s borreliovými proteiny na proužku, opláchneme proužek od séra a přidáme k němu obecnou protilátku proti všem lidským IgG či IgM (třeba myšího původu), která má připojen enzym, který pomocí barevné reakce umožní vizualizovat, kam se protilátky navázaly.



Ovšem ani při pozitivitě Western blotu není vyhráno. Problémem je i samotná dynamika tvorby protilátek. U „slušné“ infekce se detekovatelné IgM vytváří po týdnu. Při primárním stadiu erytema migrans se protilátky IgM vůbec nemusí vytvořit, nebo se vytvoří velmi pozdě. To znamená, že v době, kdy přichází pacient s flekem na noze, ještě protilátky nemá, a když se adekvátně zahájí léčba antibiotiky, ani si je nevytvoří. Pokud přichází pacient při klinickém podezření na druhé stadium nemoci, je jisté na místě sérologii provést. Nicméně potom je velmi důležité, o jakou formu se jedná a je nutné prokázat infekci i v daném orgánu, tj. v mozkomíšním moku nebo v kloubním punktátu. Velmi často se stává, že serologie v krvi je jednoznačně pozitivní a v mozkomíšním moku nebo punktátu je negativní. V tom případě se o onemocnění nejedná. Situaci občas pomůže objasnit PCR, ale ta bývá často negativní i u zcela jasně prokázaných infekcí. Velmi by nám pomohla kultivace, ale bohužel, *Borrelia burgdorferi* je spirochéta, a ty na umělých mediích nepřežívají. Zůstává možnost mikroskopického pozorování, ale to je mimořádně pracné a velmi nevytěžné.



Otázky:

1. 75-letá pacientka, t.č. hospitalizována již měsíc pro močovou infekci a plánována výměna infikovaných stentů v močovodech. Během hospitalizace opakovaně zvracela. Dle gastroskopie zjištěn zánět dvanáctníku. Předchozí zánět jícnu již nemá. Nyní opět zvrací, měla 2 průjemové stolice. Vzhledem k tomu, že na vedlejších pokoji se nachází pacient s rotavirovou infekcí a před 3 dny byla propuštěna pacientka s *rotaviry*, která nerespektovala domovní řád nemocnice a vycházela z pokoje, ošetřující lékař odebral stolicí na antigeny rotavirů, adenovirů, norovirů a astrovirů. Všechny byly pozitivní.
 - a) Jak byste zhodnotili daný výsledek?
 - b) Co byste udělali na místě ošetřujícího lékaře?
2. Na ambulanci srpnu přichází 53-letý pacient – urolog. Asi před 14-ti dny měl týden trvající bolesti hlavy. Závratě neměl, světloplachý nebyl, horečku neměl. Bolest mu v práci nepřekážela, byl schopen normálně operovat. Očkovaný proti klišťové meningoencefalitidě není. Před týdnem si nechal vyšetřit serologii klišťové meningoencefalitidy s následujícím výsledkem: Anti TBE IgM pozitivní, Anti TBE IgG pozitivní. Pacient lumbální punkci k vyšetření mozkomíšního moku odmítl. Bolesti odezněly, ale nově se objevily psychiatrické příznaky – úzkosti, deprese. Bylo provedeno párové serum s odstupem 3 týdnů od předchozího vyšetření s následujícím výsledkem: Anti TBE IgM pozitivní, Anti TBE IgG pozitivní, Avidita 87% (vysoká)
 - a) Interpretujte daný nález
 - b) Proč si myslíte, že měl pacient psychiatrické příznaky?
3. 86-letá pacientka přijata k hospitalizaci pro celkové zhoršení zdravotního stavu, malátnost, slabost. Horečku neměla. Ve vstupní laboratoři vysoká elevace zánětlivých parametrů. Odebrány 2 aerobní + 1 anaerobní hemokultura. V jedné z aerobních hemokultur hlášena pozitivita Gramm-pozitivních koků, později určených jako *Staphylococcus epidermidis*. Ostatní hemokultury němé. V močovém sedimentu mírné známky zánětu, kulivačně v moči prokázána *Escherichia coli* více než 10^5 . Terapie antibiotiky s efektem, v kontrolní laboratoři výrazný pokles zánětlivých parametrů. Na provedeném ultrazvuku a následně CT břicha zjištěny mnohočetné metastasy v játrech.
 - a) Zhodnoťte nález v hemokulturách
 - b) Zhodnoťte nález v moči
 - c) Co si myslíte o nálezu metastáz v játrech – souvisí se základním onemocněním, pro které pacientka přišla do nemocnice nebo ne? Pokud ano, jak?
4. 37-letý intravenosní narkoman s bionáhradou aortální chlopně přijat pro horečnatý stav. Ve vstupní laboratoři vysoká elevace zánětlivých parametrů. Dle provedeného echa srdce (ultrazvuk) zjištěny bakteriální vegetace na aortální bioklopní, ve 3 aerobních hemokulturách prokázán *Staphylococcus aureus*.
 - a) Zhodnoťte nález v hemokulturách
 - b) O jaké onemocnění se jedná?
5. 26-letá pacientka přijata pro průjem. Ve výtěru ze stolice zjištěna *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Campylobacter jejuni*. V moči zjištěn nezápětlivý močový sediment, kulivačně prokázána *Escherichia coli* v koncentraci 10^4 , *Klebsiella pneumoniae* v koncentraci 10^5 .
 - a) Zhodnoťte nález kulivace ve stolici
 - b) Zhodnoťte nález kulivace v moči
6. 4-letý pacient s klinicky jednoznačně vyjádřenou spálou. Před zahájením antibiotické terapie proveden výtěr z krku, kde kulivačně zjištěno: *Streptococcus mutans*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Brahmanella catarrhalis*. Terapie Prokain-Penicilinem s efektem do 3 dní.
 - a) Zhodnoťte a vysvětlete kulivační nález v krku
 - b) Byl výtěr z krku indikován (tj. odůvodněn)? Vysvětlete proč ano, nebo proč ne.
7. 17-letá pacientka přichází pro 14 dní progradující bolesti v krku, dnes od rána nemůže polykat ani sliny. Z počátku měla zvýšené teploty, nyní má 2 dny trvající horečku až 39°C . V základní laboratoři má zvýšené jaterní testy a atypické lymfocyty v krevním obraze. CRP (C-reaktivní protein, obecný marker zánětu) je středně zvýšený. Ve výtěru z krku zjištěn *Streptococcus viridans*, *Streptococcus mutans*, *Neisseria sp.*, *Leptotrichie sp.*, *Treponema sp.*, *Fusobacterium sp.* V serologii zjištěna anti VCA IgM +++, VCA IgG ++, EBNA -, EA ++, Anti CMV IgM +, anti CMV IgG -.
 - a) O jaké onemocnění se jedná?
 - b) Zhodnoťte nález ve výtěru z krku
 - c) Zhodnoťte výsledek serologie. Je třeba doplnění dalšího serologického vyšetření? Svě zhodnocení zdůvodněte.

