



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Obor zdravotní laborant

Bakalářská práce
Imunita u dětí s cystickou fibrózou

vypracovala
Anna Skalická

vedoucí bakalářské práce
Prof. MUDr. A. Šedivá CSc.

Praha 2007

*Vřelé poděkování náleží
profesorce MUDr. Anně Šedivé, CSc.
za odborné vedení a za čas,
který mi věnovala při zpracování této
bakalářské práce,*

OBSAH

I. ÚVOD

II. CÍL

III. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Historie CF

3.1.2. Výskyt

3.1.3 Dědičnost u CF

3.2. Diagnóza CF

3.2.1. Potní test

3.2.2. Molekulárně genetická diagnostika

3.2.2.1. Přímá diagnostika

3.2.2.2. Nepřímá diagnostika

3.2.2.3. Prenatální diagnostika

3.3. Mikrobiologie u pacientů s CF

3.3.1. Vyšetřované materiály

3.3.2. Citlivost k antibiotikům

3.4. Nejčastější patogeny

3.4.1. *S. aureus* a jeho diagnostika

3.4.2. *H. influenzae* a jeho diagnostika

3.4.3. *P. aeruginosa* a její diagnostika

3.4.4. Komplex *B. cepacia* a její diagnostika

3.4.5. Ostatní časté patogeny

3.5. Imunita u dětí s CF

3.5.1. Vrozená imunita

3.5.2. Vrozené imunitní reakce lokální

3.5.3. Vrozené imunitní reakce systémové

3.5.4. Imunologické vyšetření u dětí s CF

IV. PRAKTIKÁ ČÁST

4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

4.1.1. Metodika vyšetření *P. aeruginosa*

4.1.2. Výsledky vyšetření *P. aeruginosa*

4.1.3. Diskuse k vyšetření *P. aeruginosa*

4.2. Imunoglobulíny

4.1.1. Metodika vyšetření Ig

4.2.2. Výsledky vyšetření Ig

4.2.3. Diskuse k vyšetření Ig

4.3. Vyšetření podtříd IgG - metodika

4.1.1. Metodika vyšetření podtříd IgG

4.3.2. Výsledky vyšetření podtříd IgG

4.3.3. Diskuse k vyšetření podtříd IgG

4.4. Vyšetření ANCA

4.1.1. Metodika vyšetření ANCA

4.4.2. Výsledky vyšetření ANCA

4.4.3. Diskuse k vyšetření ANCA

V. DISKUSE

VI. ZÁVĚR

VII. POUŽITÁ LITERATURA

I. ÚVOD

Cystická fibróza (CF) je závažné autozomálně recesivně dědičné onemocnění způsobené mutací genu CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), který se nachází na dlouhém raménku 7. chromozomu (1). Uváděný výskyt CF je v bělošské populaci jeden případ na 2. 500 narozených dětí. Chorobu způsobují mutace CTFR genu, který ovlivňuje funkci odpovídajícího proteinu a následnou nefunkčnost membránových i iontových kanálů v postižených buňkách. V důsledku poruchy regulace iontového transportu na membránách epiteliálních buněk se mění složení a fyzikálně chemické vlastnosti na povrchu sliznic. Hlenový sekret na povrchu epitelu se zahušťuje a narušená funkce orgánů je příčinou většiny klinických příznaků CF. Onemocnění dýchacích cest a plic je nejzávažnějším projevem CF. Určuje průběh a prognózu a zodpovídá za 90% úmrtí na tuto chorobu. Pacienti s CF trpí chronickými, nejčastěji bakteriálními, respiračními infekcemi. Nejzávažnější jsou infekce způsobené Gram negativními tyčemi *Pseudomonas aeruginosa* a bakteriemi komplexu *Burkholderia cepacia*. Eradikace těchto patogenů při chronické infekci prakticky není možná a velká pozornost je věnována mechanismům, které zvyšují patogenicitu těchto mikroorganismů, nicméně uspokojivé vysvětlení chronické perzistence bakteriální infekce právě těmito specifickými bakteriemi a neschopnosti imunitního systému pacientů je eliminovat doposud neexistuje. Kromě vlivu řady genetických faktorů, které mohou modifikovat průběh onemocnění, se na variabilitě klinických projevů podílí také složky imunity (1-3).

Imunitní systém u pacientů s CF je všeobecně zkoumán hlavně v souvislosti s infekčními komplikacemi. Pozornost je soustředěována hlavně na počáteční reakce imunitního systému u CF pacientů při prvních kontaktech s bakteriemi. V rámci těchto iniciálních fází imunitní reakce hraje důležitou roli i lokální obrana na sliznicích respiračního traktu.

II. CÍL PRÁCE A ČASŤ

Cílem práce je rozbor imunologického profilu u dětí s cystickou fibrózou.

3.1. V práci je objasněna důležitost tohoto tématu vzhledem k základní diagnóze těchto pacientů. Vlastním cílem je zhodnocení vybraných vyšetření u dětských pacientů a shrnutí výsledků získaných na našem pracovišti. Vyšetření jsou vybrána tak, aby odrazila stav protilátkové aktivity pacientů s ohledem na jejich klinický stav. Tento profil byl cíleně určen, neboť přináší informaci užitečnou pro zhodnocení stavu pacientů a ovlivnění jejich léčby. V souladu s cílem práce byla diskutovaná problematika podrobena analýze z hlediska možností laboratorních vyšetření a jejich přínosu pro klinické rozhodování. Částečně je cíl práce zaměřen i na výzkumné aktivity, týkající se onemocnění cystickou fibrózou obecně.

3.1.2. Výskyt CF

Podle údajů z let 1980 - 1982 žije namočených dětí má CF (2). To znamená, že se v České republice narodí každých rok asi 28 - 40 dětí s CF. Každý 25. až 40. narozený jedinec je tedy nosičem mutace genu tohoto onemocnění. Předpokládá se, že se jedná o dědičnou, je tedy páté nejvyšší. Stává se to důležitě v každém případě. Všechny manželství pár má pak 25% šanci, že se narodí nemocné dítě.

III. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Historie CF

V roce 1938, kdy byla choroba poprvé blíže popsána patoložkou Dorothy Andersenovou, zemřelo 80 % nemocných během jediného roku, kdy se u nich CF projevila. Zlepšení této statistiky přinesla druhá polovina 40. let 20. století, kdy byla k léčení plicních chorob poprvé použita antibiotika. Začátkem 50. let potom následovalo zavedení pankreatických enzymů. Důležitým mezníkem v historii CF byl objev potní anomálie. Děti postižené CF se nepotí více než děti zdravé, jejich pot však obsahuje mnohem více solí. Objev vysoké koncentrace solí, především chloridů v potu měl velký význam pro diagnostiku. Stanovení chloridů v potu patří k základním metodám pro stanovení diagnózy CF bez ohledu na věk.

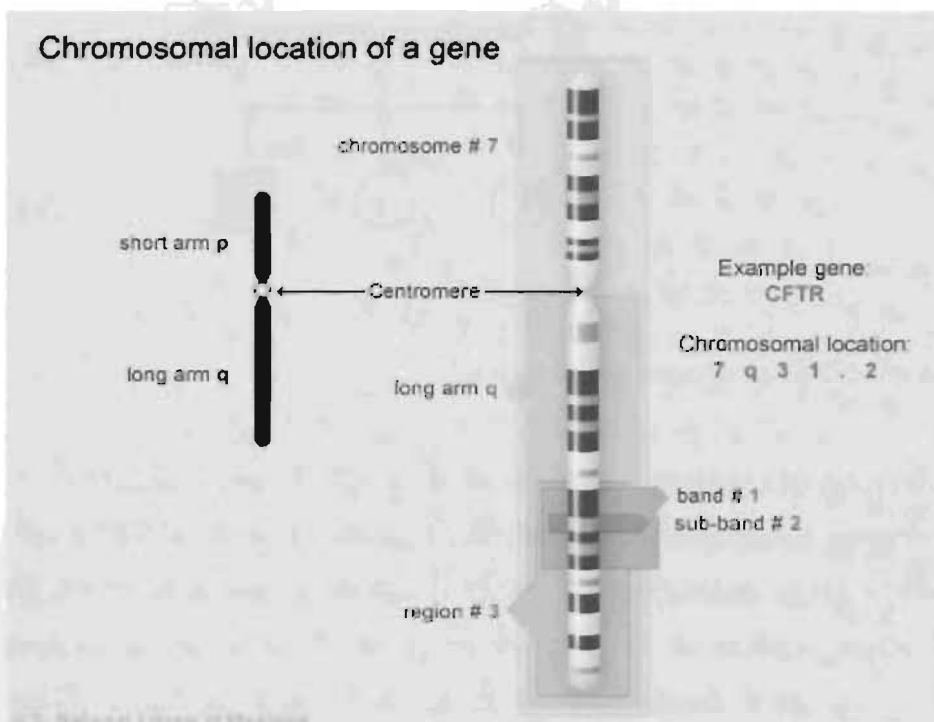
V České republice byli první nemocní s CF diagnostikováni po skončení 2. světové války.

3.1.2. Výskyt CF

Jedno z 2500 – 4500 živě narozených dětí má CF (5). To znamená, že se v České republice narodí každý rok asi 28 – 40 dětí s CF. Každý 25. až 30. zdravý jedinec je tedy nosičem mutace genu tohoto onemocnění. Pravděpodobnost, že se setkají dva nosiči, je tedy poměrně vysoká. Stane se to přibližně v každém 625. – 900. manželství. Takový manželský pár má pak 25% riziko, že bude mít nemocné dítě.

3.1.3. Dědičnost u CF

Základní příčinou CF je mutace v genu pro protein CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který byl objeven v srpnu 1989. Gen se u člověka nachází na 7. chromozomu a bylo popsáno již více než 1000 známých mutací, které se dělí do 5 funkčních tříd.

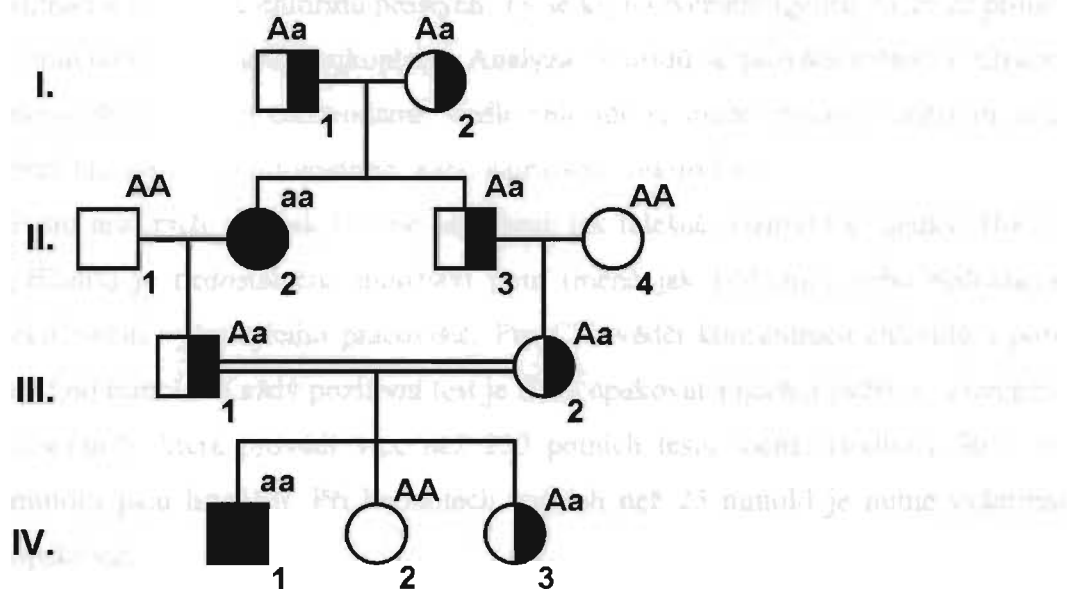


Mutace CFTR genu jsou přenášeny podle Mendelových zákonů – autozomálně recesivním způsobem (5). Autozomálně recesivní onemocnění se manifestují jen u recesivních homozygotů. Pro choroby podmíněné autozomálně recesivně platí, že zdravým rodičům se může narodit postižené dítě. Jedinec postižený CF zdědil mutace od obou rodičů. U rodičů nemutovaná alela vyváží svou aktivitou nedostatečnou funkci mutované alely, a proto se u nich CF neprojeví. Rodiče jsou nosiči mutace genu pro CF. Setkají-li se dva nosiči genu pro toto onemocnění, potom mají:

25% pravděpodobnost, že se narodí nemocné dítě;

50% pravděpodobnost, že se narodí dítě přenašeč;

25% pravděpodobnost, že se narodí dítě zdravé.



3.2.2. Molekulárně genetická diagnostika

Autosomálně recesivní dědičnost u rodiny s CF

Mutace v genu CFTR vede ke změnám v přenosu chloridových iontů [9]. Gen CFTR kóduje molekulu, která plní funkci chloridové pumpy závislé na cyklickém adenosinmonofosfátu (cAMP). Zvýšení hladiny cAMP v buňce vede ke zvýšené sekreci chloridů do dýchacích cest (5). Je změněn přenos solí, vody, sodíku a dalších iontů, což má za následek nahromadění hlenu v plicích a v zažívacím ústrojí, snížení trávicí a absorpční schopnosti dvanáctníku vinou nedostatečnosti enzymů slinivky břišní, mužskou sterilitu a zvýšený obsah solí v potu.

3.2. Diagnóza CF

Diagnóza se potvrzuje laboratorně pomocí tzv. potního testu a molekulárně genetického vyšetření.

3.2.1. Potní test

Potním testem se stanovuje kvantitativní koncentrace chloridů v potu. Jeho pozitivita není pro stanovení diagnózy nezbytnou podmínkou. Potní test spočívá v stimulaci pocení pilokarpinovou iontoforézou. Elektrody musejí být dostatečně velké (průměr více než 3 cm) a dostatečně podložené, aby nedošlo k popálení. Nejvhodnější místo umístění elektrod je pravá paže. Sběr potu se provádí do

filtračních papírků chloridů prostých. Ty se kryjí čtvercem igelitu, který se přilepí vzduchotěsně ke kůži leukoplastí. Analýza chloridů se provádí metodou titrační nebo chloridovými elektrodami. Vedle chloridů se může stanovit i natrium, a to buď plamenovým fotometrem, nebo natriovou elektrodou.

Potní test může mít jak falešně negativní, tak falešně pozitivní výsledky. Hlavní příčinou je nedostatečné množství potu (méně jak 100 mg), nebo nedostatek zkušeností vyšetřujícího pracoviště. Pro CF svědčí koncentrace chloridů v potu nad 60 mmol/l. Každý pozitivní test je třeba opakovat a nechat ověřit v referenční laboratoři, která provádí více než 250 potních testů ročně. Hodnoty 30 – 60 mmol/l jsou hraniční. Při hodnotách vyšších než 25 mmol/l je nutné vyšetření opakovat.

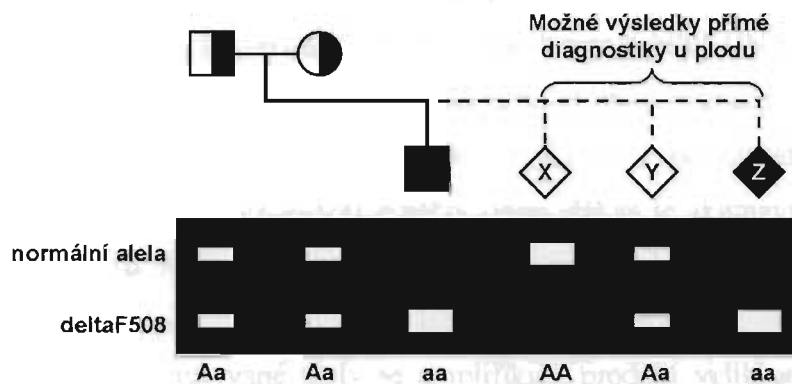
3.2.2. Molekulárně genetická diagnostika

Genetický test se provádí nejčastěji z leukocytů žilní krve, z buněk plodové vody či z jiných buněk člověka, z kterých se dá izolovat DNA (5). K odběru se používají zkumavky s antikoagulačním roztokem EDTA nebo citrátem. Mutace v CFTR genu se určují buď přímo, nebo nepřímo pomocí tzv. genových markerů.

3.2.2.1. Přímá diagnostika mutací

V České republice bylo zjištěno 29 různých mutací. Nejčastější mutací CF je F508del (5). Vyskytuje se u 71,57% všech českých pacientů. V bělošské populaci je zastoupena více než 70%. Důsledkem této mutace je delece fenylalaninu na pozici 508 (obr. 1). To vede k poruše funkce důležité domény CFTR proteinu – NBP I (nucleotide binding domains). Poruší se post-translační zpracování a transport CFTR proteinu na buněčnou membránu. V současné době se vyšetřují i další známé mutace u CF.

Přímá diagnostika umožňuje 100% jistotu při prenatální prevenci CF. Může být poskytnuta i v rodině, kde postižené dítě zemřelo, aniž bylo vyšetřeno, nebo chybí možnost vyšetřit jednoho z rodičů, pokud lze vyšetřit molekulárně geneticky postižené dítě.



Přímá diagnostika mutací

Metodika

Plná krev a krevní dřeň obsahuje buňky jak nejaderné (červené krvinky), tak jaderné (bílé krvinky). V jádrech je obsažena DNA. Jestliže izolujeme DNA z plné krve nebo kostní dřeně nejdříve lyzujeme červené krvinky, které neobsahují DNA. Tím umožníme oddělení bílých krvinek, které dále zpracováváme. Nejdříve buňky lyzujeme pomocí anionického detergentu v přítomnosti stabilizátoru DNA. DNA stabilizátor omezuje aktivitu DNáz, které jsou přítomny v buňkách a v okolním prostředí. Dalším krokem je odstranění RNA pomocí enzymů. Proteiny a další příměsi jsou odstraněny vysrážením v koncentrovaném solném roztoku. DNA, která je rozpuštěna v supernatantu, je vysrážena alkoholem a poté rozpuštěna v pufru, který obsahuje stabilizátor DNA.

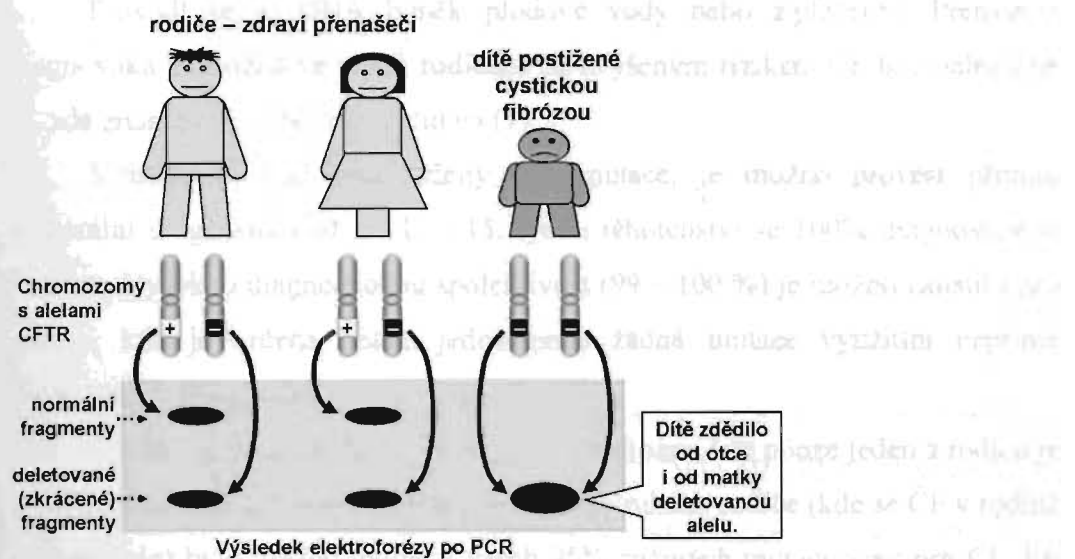
Princip metody stanovení mutace F508del

Používá se amplifikace oblasti, ve které se nachází delece, pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s jedním primerem fluorescenčně značeným.

Podmínkou pro provedení PCR je příprava primerů, které specificky hybridizují na obou koncích cílového úseku DNA a slouží jako základ pro tvorbu nových vláken.

PCR reakce začíná tepelnou denaturací vzorku DNA na dva jednoduché řetězce při teplotě 95°C. Po ochlazení vzorku na 50 – 60°C dojde k nasednutí primerů na komplementární 3' konce cílové DNA. Hybridizované primery slouží

jako základ pro syntézu nových vláken. Aby bylo dostatek substrátu pro syntézu nových vláken, je v PCR reakci přítomno dostatečné množství nukleotidů. Syntéza nových vláken je katalyzována termostabilní DNA polymerázou. Tento enzym prodlužuje vlákna DNA směrem od obou primerů ve směru od 5' konce k 3' konci při teplotě 72°C a zůstává aktivní i po zahřátí na 95°C, nutných k denuraci. Po dokončení syntézy obou vláken je zkumavka s PCR reakcí opět zahřáta na 95°C, aby došlo k denuraci nově vytvořených DNA duplexů a celý cyklus začíná znovu. Po 30 cyklech je cílová sekvence DNA namnožena více než 10^6 x. Z nemutované alely se amplifikuje produkt velikosti 97 párů bazí (bp), z mutované alely u F508 del má amplimer velikost 94 bp. Produkty reakce jsou rozděleny kapilární elektroforézou a je změřen jejich fluorescenční signál. Rychlost průchodu produktu kapilárou s denaturačním polyakrylamidovým gelem je závislá na velikosti molekuly, intenzita fluorescence závisí na množství značeného produktu.



3.3 Mikrobiologie u pacientů s CF

3.3.1. Vyšetřované materiály v mikrobiologii

U pacientů s CF se provádí mikrobiologické vyšetření sputa minimálně jednou měsíčně, dále při každém zhoršení stavu a po každém přeléčení antibiotiky. Sputum se odebírá do široké sterilní zkumavky (7). Je nutné se přesvědčit, zda jsou ve vzorku přítomny hnisavé vločky, protože vyšetřovat pouhé sliny nemá smysl. Vzorek sputa by se měl zpracovat během 2 – 3 hodin, aby bylo možné identifikovat celé spektrum patogenů. Jen některé patogeny, jako *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*, jsou ve sputu detekovatelné i za několik dní. V tomto případě se sputum uchovává při teplotě 4°C. U pacientů neschopných vykašlat sputum se vyšetřují výtěry z krku a z nosu a dále hlubší laryngeální výtěry nebo sekret získaný orofaryngeálním odsátím.

Mikroskopie sputa

Vyšetřují se hnisavé vločky, popřípadě se vzorek homogenizuje broncholyzinem (5). Po obarvení dle Grama se věnuje pozornost místům s nahromaděnými leukocyty a s cylindrickými epitelii z dolních cest dýchacích a hodnotí se vzájemný poměr plochých epitelii a leukocytů. Vzorek lze považovat za sputum v případě nálezu alespoň 25 leukocytů a maximálně 10 epiteliálních buněk v jednom zorném poli.

Kultivace sputa

Sputum se po homogenizaci vyočkovává kalibrační kličkou (5). Za signifikantní se považuje nález jakéhokoli respiračního patogena. Vzorky se očkují na krevní agar a na půdu Endovu nebo MacConkeyho. Dále se očkuje selektivní čokoládový agar s bacitracinem na hemofily a selektivní agar na burkholderie.

Využití bronchoskopického vyšetření

Jedním z nejpřesnějších vyšetření je mikrobiologické stanovení materiálu odsátého při bronchoskopickém vyšetření. Používá se v případech, kdy produkce sputa není dostatečná nebo není nemocný schopen řádně sputum odkašlat (například kojenci a batolata).

Nevýhodou bronchoskopie může být nereprezentativnost vzorku, neboť bronchoalveolární laváží obvykle získáváme vzorek pouze z jednoho nebo dvou

plicních segmentů. Zánětlivé změny přitom mohou zpočátku probíhat izolovaně jen v některých segmentech.

V praxi je dnes u nemocných s CF dávana přednost flexibilní bronchoskopii, která je obvykle prováděna bez celkové anestezie. Odpadají tak některá rizika celkové anestezie a během výkonu je zachována možnost komunikace s nemocným. To má význam při hodnocení dynamiky bronchiálního stromu při kašli nebo usilovném výdechu. Dají se tak zjistit lokalizované kolapsy dýchacích cest, jejichž znalost je důležitá pro fyzioterapii i celkovou léčbu.

3.3.2. Testování citlivosti k antibiotikům

Citlivost na antibiotika se může lišit u různých izolátů patřících k jednomu bakteriálnímu kmenu. Testování citlivosti na antibiotika u pacientů s CF by se mělo provádět minimálně každé tři měsíce (7). Metodou volby je kvalitativní difúzní disková metoda nebo kvantitativní stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Tato metoda je považována za přesnější určení citlivosti *in vitro* ve srovnání s kvalitativním diskově difúzním testem.

Difúzní disková metoda

Principem difúzní diskové metody je to, že mikrob kolem disku s antibiotikem, na něj je citlivý, nevyroste: kolem disku se vytvoří zóna inhibice růstu mikroba (8). Tato zóna musí mít určitý minimální průměr, udává se v mm a musí se měřit. Ke stanovení citlivosti mikrobů na antimikrobiální látky difúzním testem pomocí antibiotických disků slouží pevné půdy. Používá se MH-agar (Muellerův-Hintonové agar). Aby se na něm daly získat reprodukovatelné výsledky, měl by mít zaručeno standardní složení a standardní difúzní schopnost agaru. Průměr inhibiční zóny dále závisí na hustotě inokula vyšetřovaného kmene. Má odpovídat stupni 0,5 až 1 McFarlandovy zákalové stupnice. Inokulum se na misku očkuje takzvaně masivně, to znamená přelitím a následným odsátím přebytku. Po naočkování se na povrch agaru kladou antibiotické disky. Naočkované misky se inkubují 18 hodin při 37°C. Po inkubaci se výsledek diskového difúzního testu odečte. Změří se průměry inhibičních zón a ty se srovnávají s hraničním průměrem zóny referenčního kmene stejného druhu. Za citlivý se prohlásí kmen se stejnou nebo větší zónou. Kmen se zónou užší je vůči danému antibiotiku rezistentní.

Minimální inhibiční koncentrace

Ke stanovení MIC se užívá většinou mikrodiluční metoda (8). Zapotřebí jsou k ní serologické mikrodestičky, jejichž jamky jsou naplněny médiem (Muellerův-Hintonové bujon) obsahující různé koncentrace vhodných antibiotik. Z vyšetřovaného kmene se potom předepsaným způsobem připraví standardní inokulum a jehlovým inokulátem se naočkuje do jamek. Následující den se odečítá, zda bujon v jamkách zůstal čirý nebo zda vykazuje známky růstu kmene (zákal nebo sediment). Za MIC se považuje nejnižší koncentrace antibiotika, která byla ještě schopna potlačit růst. Udává se v mg/l.

3.4. Nejčastější patogeny

U malých dětí jsou hlavními patogeny *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*. Vyskytují se však i Enterobacteriaceae. V pozdějším věku pak významně stoupá procento pacientů s infekcí způsobenou *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia* (5).

3.4.1. Staphylococcus aureus

S. aureus patří mezi grampozitivní koky. Vyskytuje se jednotlivě, ve dvojicích a v nepravidelných shlucích nebo v hroznech (8).

Může být součástí běžné flóry kůže a sliznic dýchacího traktu. Zdrojem infekce bývá zdravý nosič nebo, v případě nozokomiálních infekcí, nemocniční prostředí. K onemocnění dochází zpravidla při oslabení organismu nebo při infekci velkou dávkou virulentního kmene. Stafylokokové infekce mají sklon k recidivám nebo k chronickému průběhu. Přenos se děje vzdušnou cestou, přímým stykem i nepřímě.

Bakterie produkuje mnoho faktorů patogenity zahrnujících protein A, leukocidin nebo hemoliziny, které interferují s fagocytózou (7). Bylo prokázáno, že *S. aureus* má větší adheenci k buňkám respiračního epitelu, které mají defektní CFTR protein, než k buňkám s funkčním CFTR (8).

S. aureus bývá často prvním zachyceným mikroorganismem z respiračního traktu malých dětí s CF. Infekce *S. aureus* může u některých pacientů, především pak u kojenců, způsobit těžkou plicní infekci až s fatálním průběhem.

Mikrobiologická diagnostika

S. aureus se diagnostikuje na základě mikroskopického vyšetření materiálu barveného podle Grama. Nacházíme grampozitivní koky ve shlucích. Kultivační vyšetření se provádí na krevním agaru s 10% NaCl, což je vysoce selektivní půda pro *S. aureus*. *S. aureus* vyrůstá v pigmentovaných koloniích s hemolýzou v okolí. Při testování biochemické aktivity je charakteristická tvorba plasmakoagulázy, shlukovacího faktoru a termostabilní nukleázy (8).

MRSA (Methicilin Rezistentní *Staphylococcus aureus*)

Methicilin je antibiotikum, které se používá proti stafylokokovým nákazám. Některé stafylokokové bakterie si vyvinuly proti tomuto antibiotiku odolnost. Tento typ rezistence je geneticky kódován (8). Předpokládá se, že na základě mutace příslušných genů dochází v membránách stafylokokových buněk k expresi specifické bílkoviny vázající penicilin, která má značně sníženou afinitu k penicilinovým antibiotikům. Tyto MRSA kmeny se vyskytují endemicky ve zdravotnických zařízeních jako původci nozokomiálních infekcí.

3.4.2. *Haemophilus influenzae*

H. influenzae je drobná gramnegativní bakterie. Může být součástí běžné flóry horních cest dýchacích. Většina kmenů *H. influenzae* izolovaných od CF pacientů je neopouzdřených. Znamená to, že tyto kmeny nepatří k opouzdřeným antigenním typům a až f, z nichž je nejznámější typ b způsobující meningitidy a proti němuž existuje očkování (7).

Infekce způsobené *H. influenzae* se objevují u dětí s CF časně v průběhu života. Bakterie je zodpovědná za některé akutní exacerbace a může způsobovat i chronickou infekci.

Mikrobiologická diagnostika

K diagnostice se používají kultivační média obsahující faktory X (hemin) a V (NAD tj. nikotinamidadenin dinukleotid). Na krevním agaru rostou kolem kolonií stafylokoků. Z kolonie stafylokoků difunduje do půdy NAD (faktor V), který je pro růst hemofila nezbytný. Pro druhové rozlišení hemofilů se rutinně užívá papírkových disků, které jsou napuštěny růstovými faktory X a V. Disky se kladou na naočkované půdy, které neobsahují ani hemin, ani NAD. Typizace zachyceného kmene se provádí aglutinací, testem bobtnání pouzdra a imunofluorescencí.

3.4.3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je pohyblivá gramnegativní tyčinka. V přírodě se vyskytuje především ve vodě (málo chlorované bazény, vířivky), v půdě, ve stolici domácích zvířat a lidí. Je často příčinou nemocničních nákaz (7).

Projevy infekce

P. aeruginosa může působit infekce různé závažnosti: od kolonizace sliznic, která nevyvolává imunitní odpověď, až k těžké nekrotizující bronchopneumonii. Prevalence infekce *P. aeruginosa* stoupá s věkem a v dospělosti je chronicky infikováno až 80 % nemocných (7). Některé kmeny *P. aeruginosa* se šíří z pacienta na pacienta a způsobují tak epidemický rozsev infekce. Ve většině CF center dochází k segregaci pacientů podle mikrobiologického nálezu. Striktní izolace pacientů přinesla řadě center prudké snížení incidence infekce.

Chronická infekce

Chronická infekce *P. aeruginosa* je diagnostikována na základě opakovaně pozitivních kultivačních nálezů ze sekretů dýchacích cest odebíraných minimálně po dobu 6 měsíců (7). Kratší období se v definici chronické infekce akceptuje, je-li pozitivní kultivace doprovázena sérologickým vyšetřením, které detekuje vzestup antipseudomonádových protilátek. Infekci je nutno razantně léčit. Pokud není časná infekce včas léčena, bakterie může konvertovat v mukoidní formu a infekce se stává chronickou. Bakterie se stává velmi rezistentní k antibiotické léčbě a její eradikace je prakticky nemožná. Protilátková odpověď se na přítomnost infekce stupňuje. Protilátky jsou obráceny proti většině antigenů *P. aeruginosa* a patří do třídy IgG. Vysoké hodnoty IgG korelují s horším průběhem plicní infekce, s chronickým neutrofilním zánětem a větším poškozováním plicní tkáně.

Mikrobiologická diagnostika

Většinu kmenů je možno identifikovat podle růstu na základních půdách, kde vytváří kovově lesklé kolonie. U nemocných CF se vyskytují mukózní kolonie. Převážná většina kmenů tvoří pigmenty, a to modrozelený pyocyanin, který je tvořen jen *P. aeruginosa*, a žlutozelený fluorescein, rozpustný ve vodě (8). Na krevním agaru vyvolává *P. aeruginosa* výraznou zónu úplné hemolýzy. Kultury mají charakteristický zápach po trimetylamínu. Optimální teplota růstu je

37°C, roste však i při pokojové teplotě. Potvrzení je možné biochemicky nebo aglutinací se specifickými antiséry.

Sérologické stanovení

Výhodou této nepřímé diagnostiky je detekce ze séra, tedy možnost provedení diagnostiky u každého pacienta bez potřeby sputa (7). Tato metoda může umožnit zahájení léčby v časném stádiu infekce a může také sloužit jako nástroj pro kontrolu účinnosti antibiotické léčby.

Principem je kvantitativní vyšetření hladiny antipseudomonádových protilátek ve třídě IgG pomocí metody ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Protilátky jsou namířeny proti extracelulárním *P. aeruginosa* antigenům alkalické fosfatáze, elastáze a exotoxinu A (10).

U většiny pacientů imunitní systém reaguje nejméně s jedním ze tří antigenů. Pacient je považován za pozitivního, pokud jsou v jeho séru přítomny protilátky alespoň proti jednomu antigenu.

Alkalická fosfatáza, elastáza a exotoxin A jsou vysoce imunogenní a přítomné téměř u všech *P. aeruginosa* druhů s vysokou citlivostí na analýzu. Jak falešně pozitivní, tak falešně negativní výsledky jsou téměř nemožné.

3.4.4. Komplex *Burkholderia cepacia*

Bakterie komplexu *B. cepacia* (Bcc) jsou gramnegativní aerobní pohyblivé tyčinky, které se běžně vyskytují v přírodě. V roce 1950 botanik Walter H. Burkholder popsal hnilobu cibule a bakterii, jež byla její příčinou, označil podle latinského názvu cibule druhovým názvem *cepacia* (7). Zařadil ji do rodu *Pseudomonas*. V roce 1992 byl pro *Pseudomonas cepacia* vytvořen nový rod *Burkholderia*.

Genomovar

Pro Bcc byla zavedena taxonomická jednotka genomovar (7). Genomovar je taxonomická jednotka, která odpovídá bakteriálnímu druhu, jenž je definován pouze pomocí molekulárně genetických metod. Kmeny původně označované jako *Burkholderia cepacia* se tak rozdělily do devíti genomovarů, jež se dohromady označují jako komplex *Burkholderia cepacia*. *B. cenocepacia* (genomovar III) a *B. multivorans* (genomovar II) odpovídají celosvětově za naprostou většinu infekcí Bcc u pacientů s CF.

Projevy infekce

Bcc byla poprvé popsána u pacientů s CF na konci 70. let, infekce se častěji vyskytovala u starších pacientů a objevovala se ve spojení s hospitalizací. Infekce jsou většinou chronického charakteru. Zdrojem infekce je pravděpodobně především sekret dýchacích cest nemocných pacientů. Bcc se přenáší mezi pacienty s CF a je hlavním důvodem izolaci pacientů (7). U pacientů infikovaných Bcc může dojít ke třem různým klinickým projevům (5). Zhruba u jedné třetiny pacientů nemá vliv na nemoc a její progresi. U další třetiny se projevuje jako progresivní zhoršování plicního onemocnění s opakovanými exacerbacemi. U třetí skupiny dochází k prudkému zhoršení stavu, vedoucímu rychle k smrti pacienta. Tento typ nečekaného zhoršení byl nazván Cepacia syndrom.

Faktory patogenity

K faktorům patogenity patří extracelulární produkty – lipázy, proteázy, hemolyziny, katalázy a siderofory (transportní sloučeniny vázající ionty železa). V patogenitě se dále uplatňuje lipopolysacharidový endotoxin a strukturní komponenty zprostředkovávající primární adhezi bakterií k epitelu dýchacích cest (7). Bakterie se dovedou bránit před expozicí antibiotiky přestupem do buněk makrofágů a epitelii nebo formováním biofilmu. Ve srovnání s *P. aeruginosa* je Bcc považována za virulentnější bakterii. Má kapacitu být výrazně invazivní, migrovat z lumina dýchacích cest do plicního parenchymu a kapilár a rozvinout tak septický stav. Hlavním problémem je velká primární rezistence a snadné získání další rezistence tohoto patogenu na antibiotika (7).

Mikrobiologická diagnostika

Pro detekci Bcc se používají selektivní média (BCSA, tj. *Burkholderia cepacia* Selective Agar), která obsahují jednak látky, jež potencují růst nefermentujících gramnegativních tyček, a zároveň přípravky omezující růst průvodní flóry (polymyxin B, gentamicin). Tyto půdy však zachycují i *Ralstonia pickettii* a *Burkholderia gladioli*, které se dále musí odlišit biochemickými testy. Mikrobiologická diagnostika je komplikovaná z důvodu pomalého růstu bakterií (7). Jejich úspěšná kultivace vyžaduje 48 – 72 hodin inkubace. Pomalu rostoucí drobné kolonie *B. cepacia* mohou být překryty mikroorganismy s rychlejším růstem (například pseudomonády).

Molekulárně genetické stanovení Bcc a *P. aeruginosa*

Použití PCR má řadu výhod (7). PCR detekce zaměřená na jedinečnou genetickou sekvenci dané bakterie zcela eliminuje možnost mylné identifikace bakterie, k níž při běžném mikrobiologickém provozu může dojít. Vyšší citlivost metody dovoluje záchyt patogenu v době, kdy se v klinickém materiálu vyskytuje v malém, ještě nekultivovatelném množství. Výsledky molekulárně genetické analýzy jsou dostupné během několika hodin.

Detekce se provádí pomocí dvoukolového PCR zaměřeného na bakteriální *recA* gen Bcc a na *oprL* gen *P. aeruginosa* (11). Vyšetření se provádí ze sputa, ze kterého se izoluje DNA. V prvním kole je amplifikována část *recA* genu a *oprL* gen klasickým PCR. Mix tedy obsahuje primery na obě bakterie. Analýza produktů se provádí na agarózovém gelu pomocí elektroforézy. Druhé kolo se provádí také klasickým PCR. V zásadě se připravují tři mixy. Mix na detekci obou bakterií se připravuje v případě, že je vzorek v prvním kole zcela negativní. Mix na detekci pouze Bcc v případě, že je vzorek v prvním nebo ve druhém kole *P. aeruginosa* pozitivní. Mix na detekci pouze *P. aeruginosa* v případě, že je vzorek v prvním nebo ve druhém kole Bcc pozitivní. Vyjde-li pozitivita na jednu z bakterií až v druhém kole (např. na *P. aeruginosa*), nezbyvá než vyloučit skutečnou negativitu na druhou bakterii (tj. na Bcc) provedením druhého kola pouze na tuto bakterii. Každý pozitivní vzorek na Bcc je podroben reakci s různými páry primerů, které jsou specifické pro jednotlivé genomovary.

3.4.5. Ostatní patogeny

Aspergillus fumigatus

A. fumigatus je vláknitá houba (8). Aspergily patří k nejrozšířenějším houbám v prostředí, významným pro člověka. Přenos na člověka se děje vzdušnou cestou, inhalací mikrokonidií. Aspergily jsou potenciálně patogenní houby a vznik onemocnění je podpořen nejen masivností infekce a virulencí kmene, ale především zvýšenou vnímavostí hostitele. *A. fumigatus* bývá u pacientů s CF poměrně často izolován ze sputa (5). U 5 – 15% pacientů se může rozvinout alergická bronchopulmonární aspergilóza (ABPA).

Mikrobiologická diagnostika

Pro přímý průkaz houby se odebírá sputum, bronchiální výplachy nebo biopsie tkání (8). Mikroskopický a kultivační nález aspergilů v sekretech nestačí

pro diagnózu onemocnění. Kultivace se provádí na Sabouraudově agaru. Rozhodující diagnostický význam má sérologické vyšetření. Protilátky jsou druhově specifické a zjišťují se metodou precipitace v agaru. Sledování titru specifických IgG a IgE protilátek proti *A. fumigatus* je vhodné při podezření na ABPA.

Další patogeny u pacientů s CF

U pacientů s CF se může vyskytovat mnoho dalších patogenů. Mezi ně patří: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Pandoraea spp.* (7). Tyto bakterie se většinou objevují až ve vyšším věku pacienta. Nález těchto oportunních patogenů je spojován s pokročilým plicním postižením.

Infekčními agens u CF mohou být enterobakterie (*E. coli*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiela spp.*) a atypické mykobakterie. *Mycoplasma pneumoniae* a chlamydie nemají jako patogeny větší význam u pacientů s CF.

Význam infekce *Candida albicans* a příbuzných druhů je v současné době intenzivně zkoumán (7).

3.5 Imunita u dětí s CF

CF jako monogenně vázané onemocnění má překvapivě komplexní klinické projevy a velmi výrazně individuální průběh onemocnění. Kromě vlivu genetických faktorů, které mají vliv na průběhu onemocnění, se na variabilitě klinických projevů podílí složky imunity. Jedním z hlavních projevů CF jsou opakované, chronické a celoživotní infekce, postihující zejména respirační systém s dominancí postižení plic. Právě v souvislosti s infekčními procesy se zkoumá imunitní systém u pacientů s CF. Dosud se nezjistila žádná forma primární imunodeficiency, která by přispívala ke chronické kolonizaci bakteriemi (1).

3.5.1. Vrozená imunita

Součástí vrozené imunity jsou charakterizovány nespecifickou, ale velmi rychlou a účinnou obranou proti infekci. V případě CF jsou tyto složky intenzivně zkoumány, neboť se ukazuje, že právě tato větev imunity může být klíčová, a to z důvodu modifikovaného CF prostředí prvního kontaktu imunitního

systemu s patogenem (4). Tyto první reakce se odehrávají za naprosto patologických okolností v mikroprostředí sliznic respiračního traktu s dominancí vazkého hlenu pokrývajícího tyto sliznice. Složky vrozené imunity při těchto prvních kontaktech s patogenem jednak zajišťují bariérovou ochranu organismu, dále také určují směr, kterým se bude ubírat následná specifická imunitní odpověď. V respiračním traktu je první bariérová funkce zajištěna několika velmi účinnými mechanismy, z nichž pouze některé mají čistě imunitní funkci. V první řadě nastupují procesy mukociliární clearance, které jsou zásadně porušeny v prostředí CF plic. Takováto porucha velmi výrazně ovlivňuje další, nyní již imunitně zprostředkované pochody, které probíhají na povrchu sliznice. Na tomto rozhraní působí jednak buňky nesoucí imunitní funkce, jednak humorální komponenty, sekretované na povrch sliznice. Z buněk jsou to hlavně plicní makrofágy, neutrofilové, ale také ve významné míře epitelální buňky. Všechny tyto buněčné složky, hlavně makrofágy a neutrofilové, mají za úkol rozpoznat, pohltnout a zpracovat patogeny, které se v tomto prostředí nacházejí. Navíc všechny tyto buňky, včetně epitelů, sekretují imunologicky aktivní látky do daného mikroprostředí. Tyto látky mají výrazné antimikrobiální účinky. Jsou to většinou peptidy či proteiny, které inhibují patogeny a zasahují do následné imunitní reakce (12). Antimikrobiální peptidy jsou významnou, evolučně velmi starou součástí obrany organismu. Mezi celou škálou takových látek jsou jedny z nejlépe charakterizovaných lokálně působících defensinů a kathericidiny (13). Obě tyto kategorie jsou velmi intenzivně zkoumány v souvislosti s CF a chronickou plicní infekcí.

3.5.2. Vrozené imunitní reakce lokální

Předpokládá se úloha lokálních antimikrobiálních peptidů, defensinů a kathericidinů. Defensiny se rozlišují na alfa a beta defensiny (13). První jsou sekretovány neutrofilové, beta defensiny jsou hlavně produkty epitelů a submukózních žláz. Kathericidiny jsou také nacházeny na povrchu epitelální vrstvy, kam jsou sekretovány v přítomnosti zánětu. Z prací poslední doby vyplývá, že účinnost těchto antimikrobiálních látek je v prostředí CF plic snížena (14). Nicméně mechanismy, které vedou k této poruše v první linii obrany, nejsou zcela jasné. V podstatě v tomto směru existují dvě hypotézy, které přisuzují snížení účinnosti vysokému obsahu soli ve vazkém hlenu, či snížené produkci

těchto látek poškozenými buňkami sliznic. Kombinace těchto faktorů není vyloučena. Každopádně první kontakty imunitního systému s patogeny v CF plicích vedou ke zcela neefektivní eradikaci těchto mikroorganismů a ovlivňují negativně další kroky v kaskádě imunitních reakcí.

V této souvislosti je třeba zmínit možnou "imunologickou" úlohu vlastního CFTR. CFTR může sloužit jako specifický receptor jednak pro *P. aeruginosa*, jednak pro LPS odvozeného z řady typických G- patogenů (14). Při základní patologii CFTR potom odchází ke zvýšené náloži patogenů a LPS v místě zánětu a k enormnímu zvýšení zátěže imunitního systému (15).

Všechny tyto okolnosti vedou k zánětlivým procesům a posléze dospějí do stadia chronického zánětu v plicích CF pacientů. Tento stav je charakterizován trvalým influxem hlavně neutrofilů a makrofágů do místa zánětu, infiltrací sliznice, sekrecí řady imunologicky velmi aktivních látek s dominancí cytokinů a posléze k destrukci sliznice. Lokální destrukce je v bludném kruhu imunitních reakcí potencována působky sekretovanými přítomnými infiltrujícími buňkami, jakou jsou proteázy a oxidanty. Destrukce buněk v místě zánětu včetně epitelii vede k uvolnění obsahu těchto buněk včetně DNA, která dále přispívá k viskozitě sekretu.

Komplex rozpoznávající LPS

Lipopolysacharid (nazývaný také endotoxin) je jedním z nejdůležitějších hráčů ve vztahu k imunitním reakcím u CF. LPS je virulentním faktorem G-bakterií, typických patogenů u CF. LPS je významným stimulem imunitního systému v produkci prozánětlivých cytokinů, proteáz, eikosanoidů a reaktivních kyslíkových a dusíkatých látek (16). Reakce imunitního systému proti LPS jsou tedy zásadní pro eradikaci infekce. Ve vzájemných interakcích LPS a buněk organismu byl v poslední době učiněn významný pokrok. Byly hlavně ozřejměny molekulární vazby LPS na buňku (17). LPS je rozeznáván komplexem molekul, mezi nimiž jsou zásadní molekuly CD14 ve formě solubilní či membránové (na povrchu makrofágů, neutrofilů, a žírných buněk), lipopolysacharid binding protein (LBP) a zástupci rodiny Toll-like receptorů (TLR). TLR je relativně nedávno objevená skupina receptorů, které zajišťují první kontakt buněk organismu s celou škálou mikroorganismů (18, 19). V současné době je známo jedenáct zástupců této skupiny. Jednotliví členové rozpoznávají poměrně specificky určité typy struktur pocházejících z patogenů, z nichž pro CF jsou

významné molekuly TLR4, respektive TLR2, rozpoznávající LPS, a TLR5, reagující na flagelin bakterií. Komplex CD14, LBP a TLR je nyní předmětem velmi aktivního výzkumu, zahrnujícího zkoumání reakcí vyvolaných vazbou *P. aeruginosa* či *B. cepacia*. Detailní pochopení těchto vazeb a jejich odlišného charakteru u CF přinese velmi důležité poznatky pro patogenezi chronické infekce u CF. Tyto vazby vedou v buňkách imunitního systému i v dalších buňkách včetně epitelů k signalizaci a následné produkci dalších důležitých molekul. Mezi tyto molekuly patří i cytokiny.

3.5.3. Vrozené imunitní reakce systémové

Mezi vrozenými imunitními mechanismy systémovými humorální povahy nese klíčovou úlohu systém komplementu. Systém komplementu je složitým komplexem základní kaskády komplementu a řady regulačních složek. V celém tomto systému je popsána řada vrozených i získaných patologií, nicméně žádná z těchto situací nebývá spojována s CF. U pacientů s CF se sice nenalezly příčinné poruchy komplementového systému, nicméně výzkum poslední doby ukazuje, že určitou roli v patogenezi chronické infekce bude komplement u CF hrát. Tato úloha je nyní spojována s MBL proteinem syntetizovaným v játrech. Patří do skupiny lektinů podílejících se na specifické vazbě k různým cílovým molekulám (tzv. pattern recognition receptors) a je schopný se efektivně vázat na polysacharidové struktury na povrchu mikrobů (na povrchu např. *S. aureus*, *B. cepacia* komplex, ale nikoli *P. aeruginosa*) (7, 9). Do stejné velké rodiny patří i výše popsané TLR. MBL bakterie buďto neutralizuje nebo je opsonizuje aktivací komplementu, pomocí tzv. lektinové cesty. V závislosti na individuálních polymorfismech genu pro MBL u daného jedince (popsáno i u CF pacientů) jsou dány sérové hladiny tohoto lektinu. Jednotlivé takové varianty jsou potom spojeny s různou odpovědí na infekci. U CF jsou ve zvýšené míře přítomny varianty vedoucí k deficienci MBL vedoucí k porušené neutralizaci lipopolysacharidů (LPS) a dalších toxických substancí uvolňovaných z patogenních mikrobů, a tím k nepříznivému průběhu chronických infekcí (7, 20).

Přestože poruchy v samotné kaskádě komplementu nebyly u CF popsány, komplement se jistě účastní v patologických procesech imunokomplexových. Komplement u CF je aktivován hlavně bakteriemi či LPS z těchto patogenů.

Samotné imunokomplexy byly ve zvýšené míře nalezeny u některých pacientů s CF, a to zvláště u pacientů s probíhající artritidou. V některých případech byly imunokomplexy nalezeny u pacientů s CF i ve sputu, kde obsahovaly přímo LPS.

3.5.4. Imunologické vyšetření u dětí s CF

U pacientů s CF jsou prováděna všechna rutinní imunologická vyšetření. U pacientů ve stabilizovaném stavu se tak děje v ročních intervalech, pokud to jejich stav nevyžaduje častěji.

Při vyšetření imunitního systému u pacientů s CF jsou využívány všechny dostupné laboratorní metody běžně užívané v imunologii. Elektroforéza, nefelometrie, aglutinační metody, imunoreaktivní metody se značenými protilátkami, imunoblotting, imunofluorescence, chemiluminiscence, imunohistochemie, průtoková cytometrie, molekulárně-biologické metody. Využívají se i funkční testy, např. blastická transformace, cytotoxické testy, bactericidní testy a testy oxidačního metabolismu.

Rutinně jsou vyšetřovány složky vrozené imunity, a to jak složky humorální, tak buněčné. Dále jsou rutinně vyšetřovány hladiny protilátek (IgM, IgA včetně slizniční komponenty, IgE, IgG s možností stanovit jednotlivé podtřídy) a celé řady autoproti látek např. antinukleární, anticytoplazmatické, antigliadinové, protilátky namířené proti endomyziu, tkáňové transglutamináze, proti imunoglobulinovým molekulám (RF) a mnoho dalších. V indikovaných případech je možno vyšetřit i specifickou buněčnou složku imunitního systému (počet B i T lymfocytů včetně zastoupení jednotlivých subpopulací).

Rutinně jsou vyšetřovány titry postinfekčních a postvakcinačních protilátek, zvláště proti kapsulárním patogenům častěji se vyskytujícím u CF (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*). Děti s CF tvoří dostatečné hladiny postvakcinačních protilátek při stejných dávkách očkovacích látek jako zdravé děti (22).

Naše pracoviště zavedlo mezi rutinní vyšetření kvantitativní stanovení specifických protilátek ve třídě IgG proti *P. aeruginosa* s využitím serologických metod (enzymatická imunoanalýza). Výhodou této nepřímé diagnostiky je detekce ze séra, tedy možnost provedení diagnostiky u každého pacienta bez potřeby sputa, což je přínosné hlavně u malých dětí, z nichž většina není schopna vykašlávat. Podle výše titru protilátek je také možno odlišit časnou infekci, kdy

jsou již protilátky přítomny, a infekci chronickou. Dále je možno dle hladiny titru antipseudomonádových protilátek sledovat dynamiku infekce a možnost korelovat serologické výsledky s mikrobiologickou kultivací a případně molekulárně-biologickou detekcí (pomocí polymerázové řetězové reakce) tohoto patogena ve sputu, sekretu dolních cest dýchacích odebraných při bronchoskopickém vyšetření, sekretu horních cest dýchacích či ve výtěru z krku.

U některých CF pacientů jsou stejně jako u zdravé populace vyšetřovány hladiny specifických IgE namířené proti běžným alergenům. V indikovaných případech, často u pacientů se zvýšenou hladinou celkového IgE, je nyní možno vyšetřit hladinu specifického IgE proti *Aspergillus fumigatus*. Incidence tohoto patogenu v současné době výrazně narůstá, zvláště mezi dospělými CF pacienty. Stanovení specifického IgE proti *Aspergillus fumigatus* patří k významným diagnostickým kritériím při stanovení diagnózy alergické bronchopulmonální aspergilózy (ABPA) (23).

Dále je možno stanovit sérovou hladinu lektinu vážícího manózu (MBL) s využitím enzymatické imunoanalýzy (ELISA). MBL je důležitou součástí vrozeného imunitního systému. MBL byl a je intenzívně zkoumán jako jeden z kandidátních genů modifikujících průběh zvláště plicního onemocnění u CF. Byly popsány geneticky podmíněné nízké hladiny tohoto lektinu asociované se závažnějším průběhem některých onemocnění (např. chronická revmatoidní artritida, jaterní cirhóza atd.), stavů po transplantaci, u osob léčených chemoterapií, s častějším výskytem infekčních onemocnění či závažnější průběh některých infekcí zvláště v kojeneckém věku (24). Vzhledem k lokalizaci chronické infekce u CF pacientů v plicích je často s výhodou vyšetřovat nejenom séra pacientů, ale i další tělní tekutiny či produkty. S využitím průtokové cytometrie je stanovováno zastoupení populací buněk (leukocytů, lymfocytů B, T i jejich jednotlivých subpopulací) ve vzorcích bronchoalveolárních laváží (BAL) odebraných při bronchoskopickém vyšetření pacientů informující o aktuálním stavu v respiračním traktu. S využitím serologických metod je možno měřit hladiny různých imunologických působků ve slinách pacientů, v eluátech stolice, v supernatantech BAL získaných při bronchoskopických vyšetřeních pacientů. Mezi neinvazivní vyšetření patří odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu a následné využití serologických metod pro detekci různých imunologických mediátorů v tomto materiálu (např. prozánětlivých cytokinů IL-1, TNF-alfa,

chemotakticky působícího interleukinu 8, metabolitu kyseliny arachidonové - LTB4 a mnoho dalších).

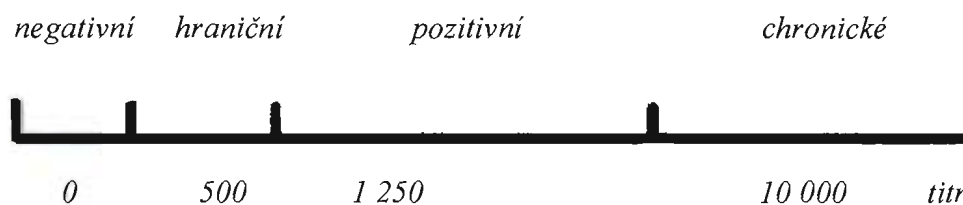
IV. PRAKTICKÁ ČÁST

Vlastním cílem praktické části je zhodnocení vybraných vyšetření u dětských pacientů a shrnutí výsledků získaných na našem pracovišti.

4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

4.1.1. Metodika vyšetření *P. aeruginosa*

Principem je kvantitativní vyšetření hladiny antipseudomonádových protilátek přítomných *in vivo* v periferní krvi pacientů s CF pomocí enzymatické imunanalýzy (ELISA). Tato metoda je velice citlivá a detekuje protilátky ve třídě IgG proti 3 specifickým antigenům *P. aeruginosa* (alkalická proteáza, elastáza a exotoxin A). Ke stanovení pozitivního výsledku stačí pozitivita jedné z protilátek. Podle výše titru protilátek je možno odlišit infekci od kolonizace. U pacientů s titrem vyšším než 1 : 10 000 lze infekci označit jako chronickou.



Výhodou této nepřímé diagnostiky je detekce ze séra, tedy možnost provedení diagnostiky u každého pacienta bez potřeby sputa, nevýhodou je jistá finanční nákladnost diagnostických kitů.

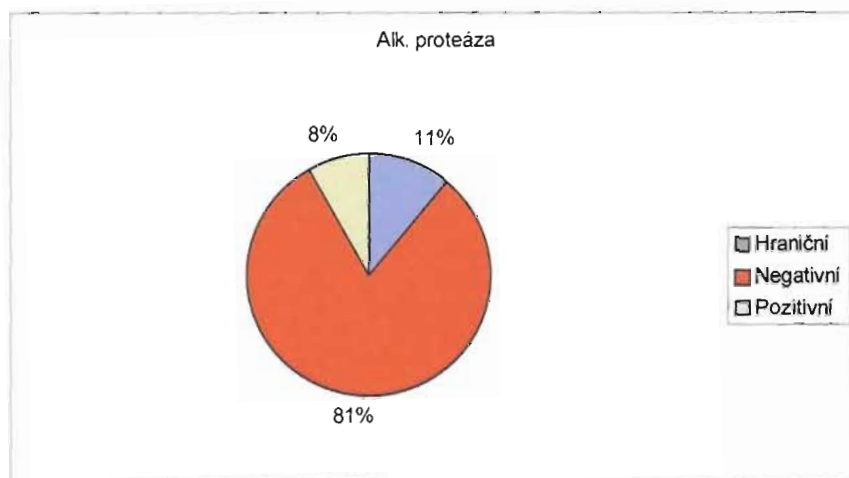
Výrobce kitu: Mediagnost, Diagnostika mbH, Reutlingen, Germany

4.1.2. Výsledky vyšetření *P. aeruginosa*

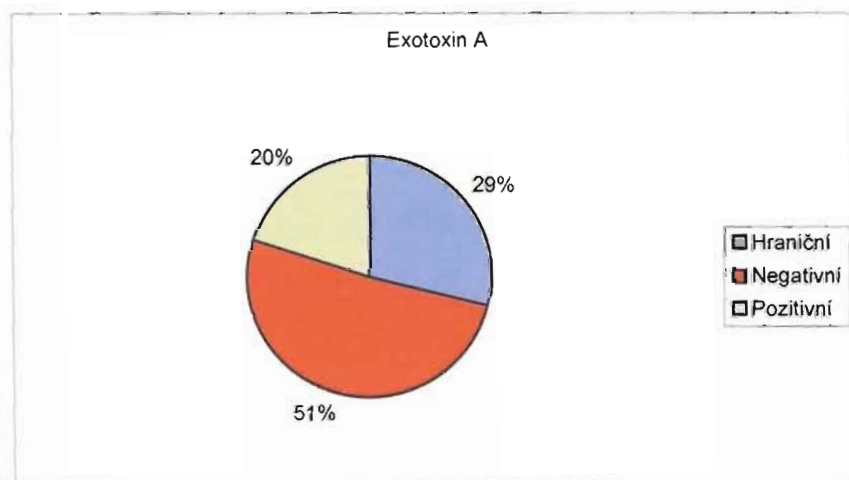
Bylo provedeno 274 vyšetření u 167 pacientů s potvrzenou diagnózou s CF. Výsledky jsou shrnuty v následujících grafech a tabulkách.

Při vyšetření alkalické proteázy bylo nalezeno 222 vyšetření negativních (81%), 29 hraničních (11%) a 23 pozitivních (8%). U elastázy bylo nalezeno 207 negativních vyšetření (76%), 36 hraničních (13%) a 31 pozitivních (11%). U vyšetření exotoxinu A bylo nalezeno 138 negativních výsledků (51%), 80 hraničních (29%) a 56 pozitivních (20%). U dětí s pozitivním výsledkem byl

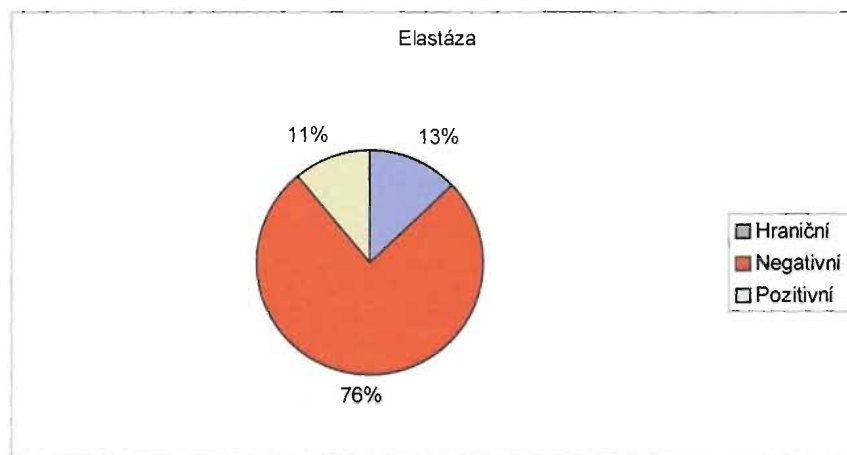
nalezen v 48% jeden antigen, u 27% dva antigeny a u 25% tři pozitivní antigeny.



Graf č. 1 - Výsledky vyšetření alkalické proteázy



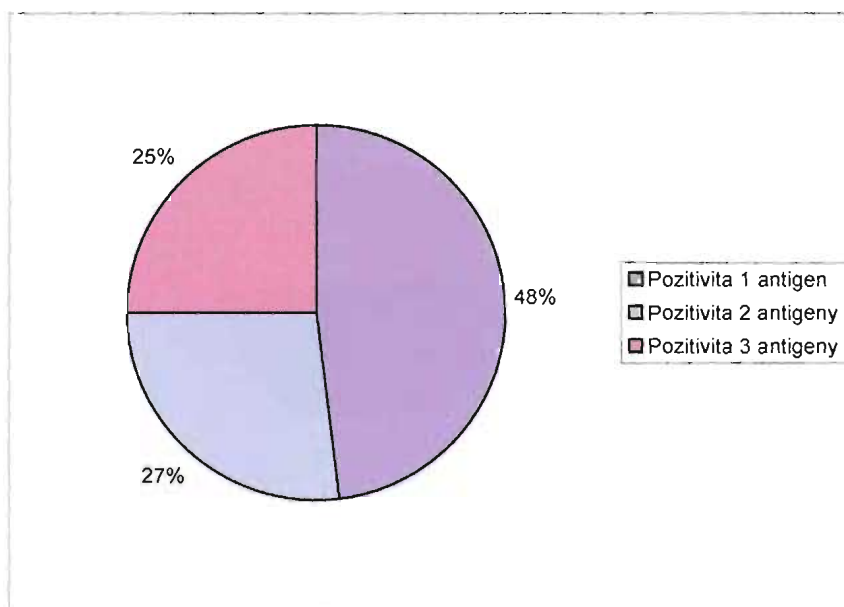
Graf č. 2 - Výsledky vyšetření Exotoxinu A



Graf č. 3 - Výsledky vyšetření Elastázy

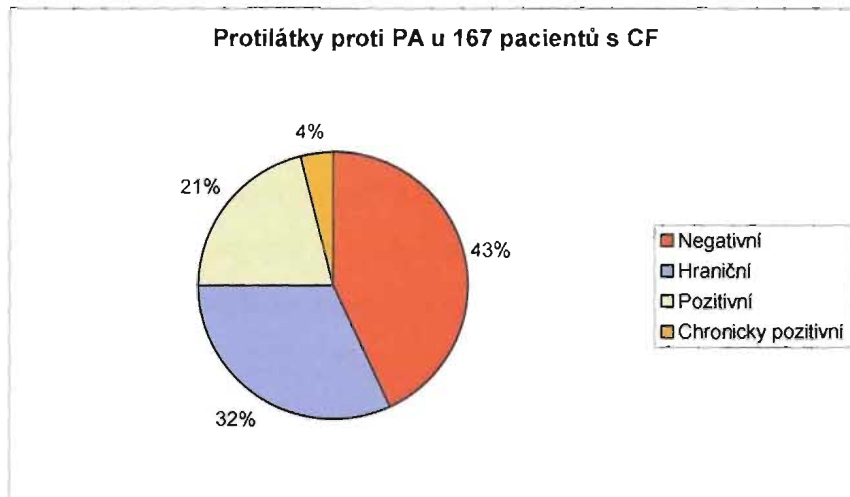
<i>Počet vyšetření</i>	<i>Alk. proteáza</i>	<i>Elastáza</i>	<i>Exotoxin A</i>
Hraniční	29	36	80
Negativní	222	207	138
Positivní	23	31	56

<i>V %</i>	<i>Alk. proteáza</i>	<i>Elastáza</i>	<i>Exotoxin A</i>
Hraniční	11	13	29
Negativní	81	76	51
Positivní	8	11	20



Graf č.4 - Výsledky v počtu pozitivity na množství antigenů

	<i>V %</i>	<i>počet</i>
Pozitivita 1 antigen	48	69
Pozitivita 2 antigeny	27	39
Pozitivita 3 antigeny	25	37
		145



Graf č. 5 - Celkové zhodnocení positivity vyšetření

	<i>V %</i>	<i>Počet pacientů</i>
<i>Anti-P.aeruginosa</i>		
Negativní	43	85
Hraniční	32	67
Pozitivní	21	46
Chronicky pozitivní	4	8

4.1.3. Diskuse k vyšetření *P. aeruginosa*

Infekce *P. aeruginosa* má u cystické fibrózy poměrně charakteristický průběh. První, časná fáze infekce je způsobena nemukoidní formou *P. aeruginosa*, která je obecně citlivější na antibiotickou léčbu. Pokud není tato fáze včas léčena, bakterie vždy konvertuje v mukoidní formu a infekce se stává chronickou s opakovanými epizodami exacerbace plicního postižení. Morfologická změna bakterie, odpovídající *in vivo* tvorbě exopolysacharidu alginátu a formování biofilmu, má za následek zřetelný nárůst rezistence k ATB terapii. I z tohoto vyplývá, že úspěch léčby závisí především na jejím včasném zahájení, kdy postihuje *P. aeruginosa* ještě v její nemukoidní formě. Problémem je ovšem detekce bakterie, neboť v této počáteční fázi infekce je přítomno menší množství patogenů. To klade vyšší nároky na použité diagnostické metody, jež musí být dostatečně senzitivní, ale zároveň velmi spolehlivé. K tomu přispívá právě stanovení anti pseudomonasových protilátek.

Chronická infekce *Pseudomonas aeruginosa* je definovaná jako trvalá perzistence bakterie po dobu 6 měsíců a více. Charakteristickým příznakem trvající chronické infekce *P. aeruginosa* je produkce mukoidního alginátu a tvorba mikrokolonií, které jsou špatně prostupné pro antibiotika. Takzvaný mukoidní fenotyp *P. aeruginosa* je tedy spojen s horším průběhem infekce. Proto je velmi důležitá prevence a včasné zachycení počáteční kolonizace *Pseudomonas aeruginosa* v době, kdy bakterie ještě nebývá přítomna v mukoidní formě. Nutná je časná razantní antibiotická léčba. Tak lze chronickou kolonizaci oddálit o několik měsíců až let.

Úspěšná i.v. antibiotická terapie je spojována se stabilním či klesajícím titrem protilátek.

4.2. Imunoglobuliny

4.2.1. Metodika vyšetření Ig

Vyšetření vybraných parametrů humorální imunity bylo prováděno nefelometricky za použití odpovídajících antisér (Beckman Coulter, USA). Výsledky byly hodnoceny vzhledem k normám odpovídajícím věku jednotlivých pacientů.



Antiséra s čárovým kódem pro vyšetření

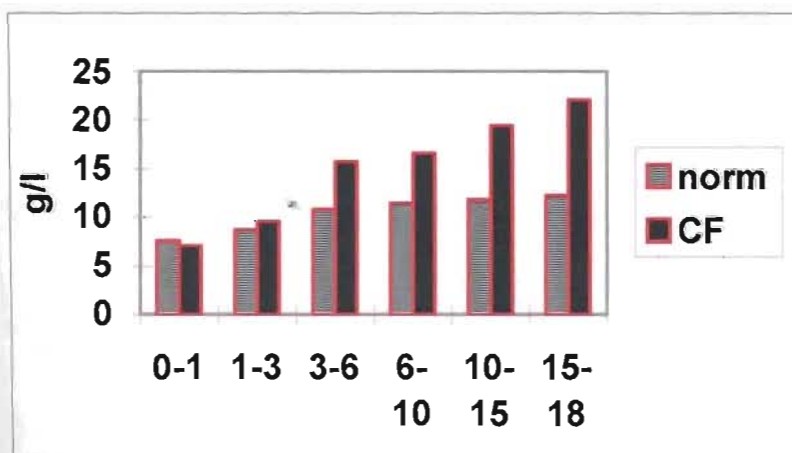
Princip použité metody byl nefelometrický, kdy měříme intenzitu difúzně rozptýleného světla na dispergovaných částicích. Rozptýlené světlo vychází z roztoku všemi směry a měří se pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření. Nefelometr Immage používá jako zdroj světla helium – neonový laser. K nefelometrii a kompetitivní nefelometrii se při měření používá vysoce citlivá NIPIA (Near Infrared Particle Immunoassay) a kompetitivní NIPIA, která udržuje konstantní intenzitu limitovaného světelného paprsku ve vlnové délce 940 nm. NIPIA detekuje přítomnost a hladinu specifických proteinů i o nízké molekulové hmotnosti. Při průchodu světla roztokem obsahujícím suspendované částice stoupá v důsledku tvorby imunokomplexů během reakce antigen-protilátka množství rozptýleného světla. Testem měříme rychlost tohoto nárůstu.



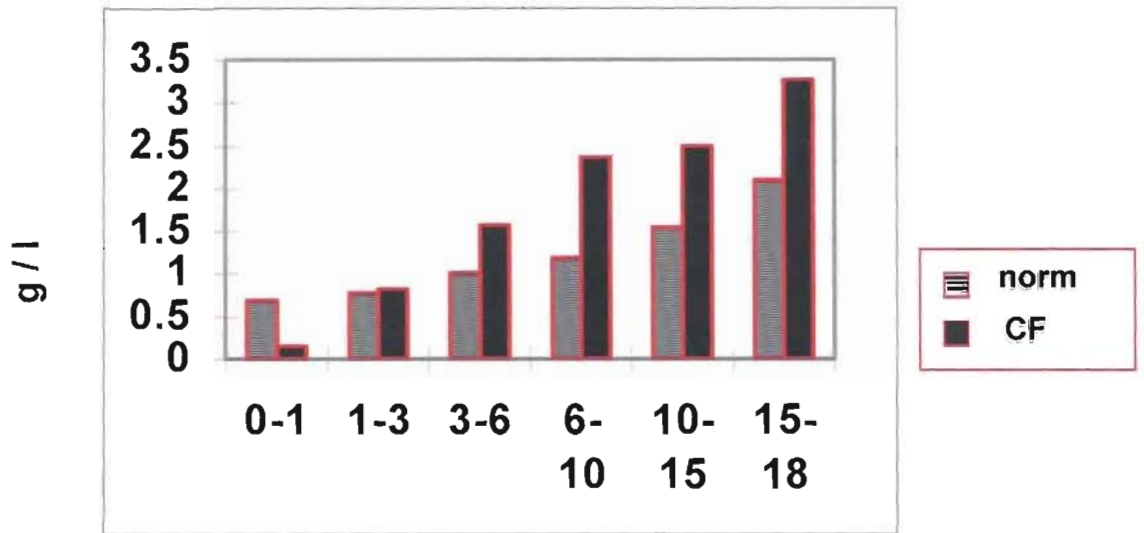
Nefelometr Image

4.2.2. Výsledky vyšetření Ig

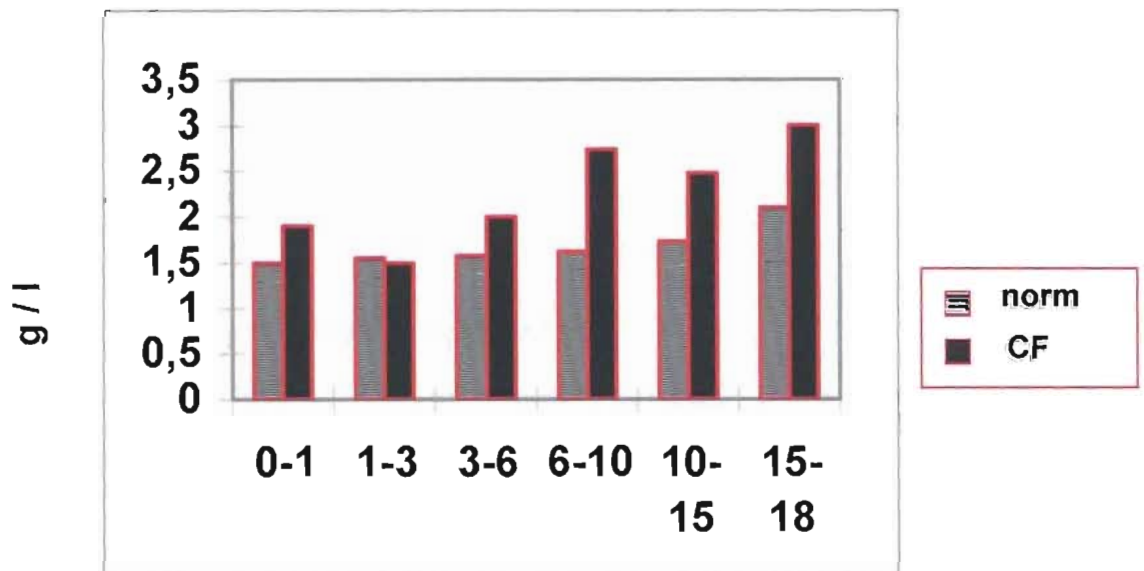
Celkem bylo vyšetřeno 74 dětí ve věku od 5 měsíců do 18 let, v souboru bylo 32 dívek a 42 chlapců, 18 dětí bylo vyšetřeno opakovaně. Ve věkové skupině 1-3 roky bylo 9 dětí, ve skupině 3-6 let 8 dětí, ve skupině 6-10 let 21 dětí, ve skupině 10-15 let 22 dětí a ve skupině 15-18 let 14 dětí. Všechny děti měly potvrzenou diagnózu CF podle klinických nálezů, vyšetření chloridů v potu a nakonec molekulárně genetickým potvrzením mutací CFTR.



Graf č. 6 - Výsledky vyšetření IgG



Graf č. 7 - Výsledky vyšetření IgA



Graf č. 8 - Výsledky vyšetření IgM

4.2.3. Diskuse k vyšetření Ig

Vyšetření imunoglobulinů v izotypech IgG, IgA a IgM u dětí s CF kopírovalo dynamické změny v rozvoji protilátek, jež jsou známé u normálních dětí v jednotlivých věkových skupinách. Ve výsledcích IgG byla nalezena velmi mírná hypogamaglobulinémie v nejnižší věkové skupině do 1 roku. Již od následující věkové skupiny 3-6 let narůstala hyperimmunoglobulinémie, jež se postupně zvyšovala až k extrémním hodnotám IgG nalézaným u dospívajících. Podobně stejnou dynamiku vykazuje IgA. Tato křivka se již plně netýká IgM, které je více ovlivněno momentálním stavem pacienta než jeho dlouhodobým chronickým průběhem, i když i v tomto případě je jasné výrazné zvýšení hodnot tohoto imunoglobulinu.

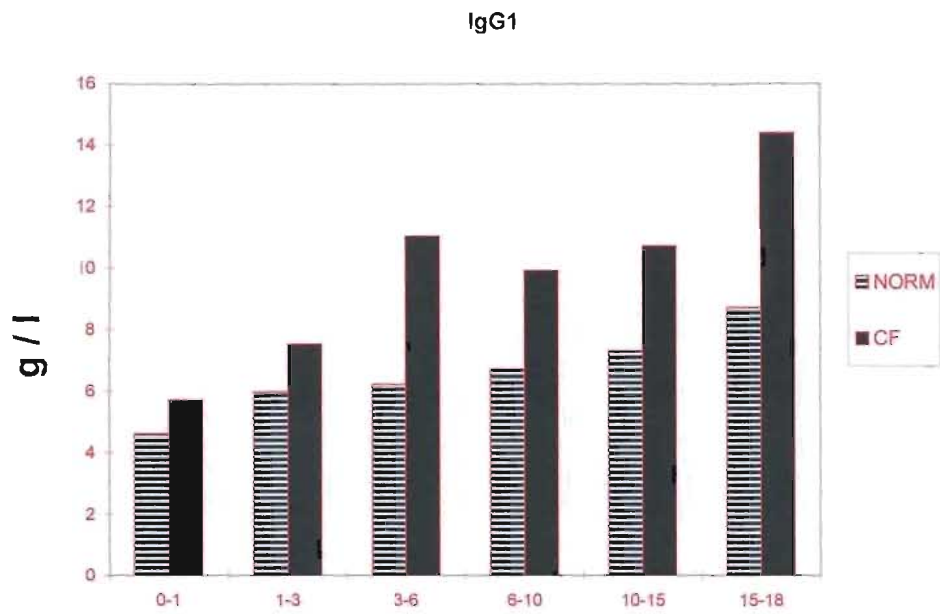
4.3. Vyšetření podtříd IgG

4.3.1. Metodika vyšetření podtříd IgG

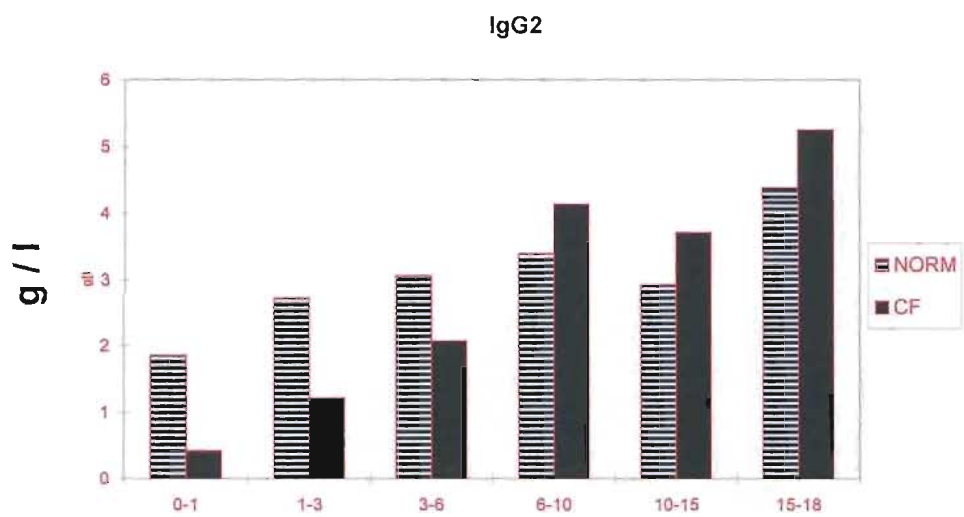
IgG podtřídy byly vyšetřeny nefelometricky za použití antisér proti jednotlivým podtřídám IgG1 až IgG4 (Binding Site, Birmingham, Velká Británie). Princip metody je stejný jako u předchozího vyšetření imunoglobulinů.

4.3.2. Výsledky vyšetření podtříd IgG

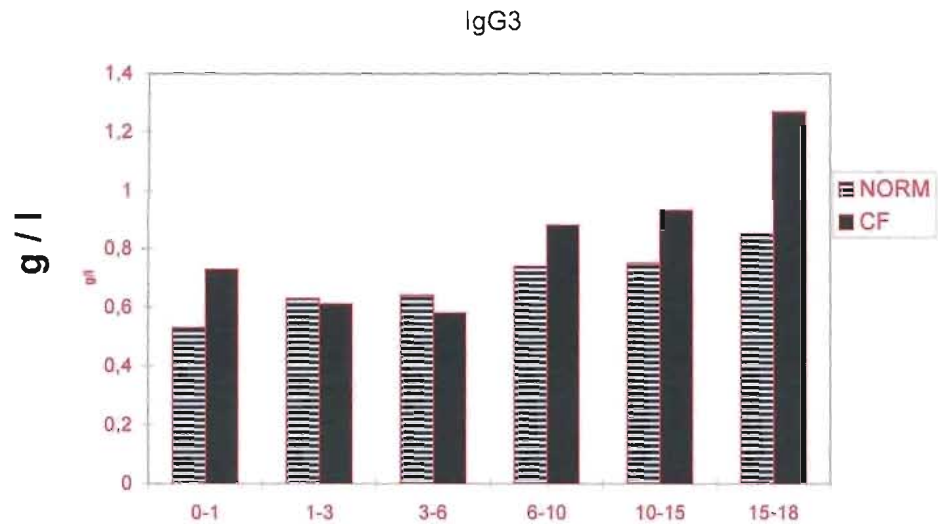
Vyšetření podtříd IgG bylo provedeno u 53 dětí do 18 let s potvrzenou dg CF. Z tohoto souboru bylo 25 dívek a 28 chlapců.



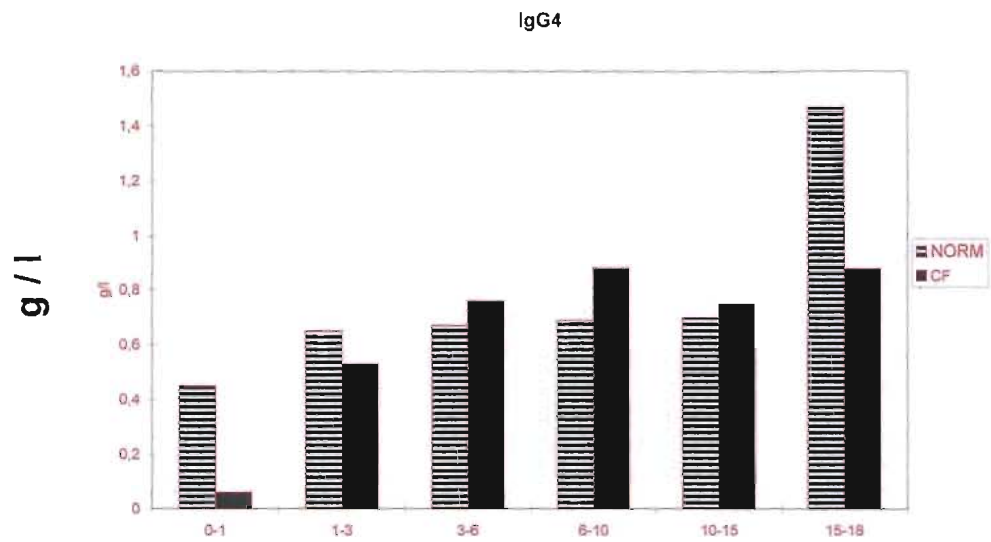
Graf č. 9 - Výsledky vyšetření podtříd IgG 1



Graf č. 10 - Výsledky vyšetření podtříd IgG 2



Graf č. 11 - Výsledky podtříd IgG 3



Graf č. 12 - Výsledky vyšetření podtříd IgG 4

4.3.3. Diskuse k vyšetření podtříd IgG

Ve vyšetření podtříd IgG je jasné snížení hodnot IgG2. IgG1 a IgG3 je zvýšeno u pacientů s CF již od raného dětství. Hodnoty IgG4 jdou velmi těžko posuzovat pro jejich velmi až extrémně nízké hodnoty (IgG4 se pohybuje v nejnižších věkových skupinách v setinách a desetínách g/l). V jednotlivých věkových skupinách bylo nalezeno snížení IgG2 u nejmenších dětí. Při srovnání s normálními hodnotami imunoglobulinů vzhledem k věku není toto snížení, stejně tak jako nižší IgG celkové, statisticky významné, nicméně trend rozvoje IgG2 od nízkých hodnot do typické hypergamaglobulinemie je jasně patrný. Zajímavým faktem, týkajícím se právě imunoglobulinu IgG2, je skutečnost, že jako jediný z izotypů imunoglobulinů je pod vlivem Th1 větve imunitní odpovědi. Nabízí se otázka, zda defekt imunity není u pacientů s CF hlubší a zda snížení IgG2 není odrazem dysfunkce protektivní větve Th1 reakce. IgG2 má zásadní úlohu v obraně proti mikroorganismům s polysacharidovými antigeny. Byla zjištěna jeho role v obraně právě proti kmenům *Pseudomonas* (7).

4.4. Vyšetření ANCA

4.4.1. Metodika vyšetření ANCA

Při stanovení ANCA protilátek se používá technika nepřímé imunofluorescence, při níž se patientské vzorky a příslušné kontrolní vzorky inkubují na substrátu s purifikovanými lidskými neutrofilů. Nenavázané protilátky se odmyjí a poté se přidá konjugát příslušné sekundární protilátky s fluoresceinem. Nenavázaný konjugát se odmyje jako v předcházejícím kroku. Zpracovaná substrátová skla se vyhodnocují fluorescenčním mikroskopem. U pozitivních pacientů vyhodnocujeme typ fluorescence P a C.

Použitá souprava - Binding Site, Birmingham, Velká Británie.

Stanovení PR3 a anti BPI protilátek se provádí metodou ELISA. BPI (bactericidal permeability-increasing protein) je membránový protein o

molekulární váze 55kD. BPI je jedním z mikrobicidních proteinů buňky, které jsou cílovými antigeny ANCA.

Princip metody

Antigen BPI (PR3) je navázán na dno mikrotitračních jamek. Jsou-li v séru přítomny protilátky proti těmto antigenům, zachytí se v mikrojamkách. Nenavázané sérové protilátky se odstraní promytím. Při druhé inkubaci na specifické protilátky (IgG) ze vzorku naváže značená zvířecí protilátka proti příslušnému lidskému imunoglobulinu IgG, konjugovaná s křenovou peroxidázou (konjugát). Po odstranění nenavázaného konjugátu promytím se detekuje peroxidázová aktivita aplikací jednosložkového substrátu s TMB. Enzymová reakce se zastaví přidáním zastavovacího roztoku.

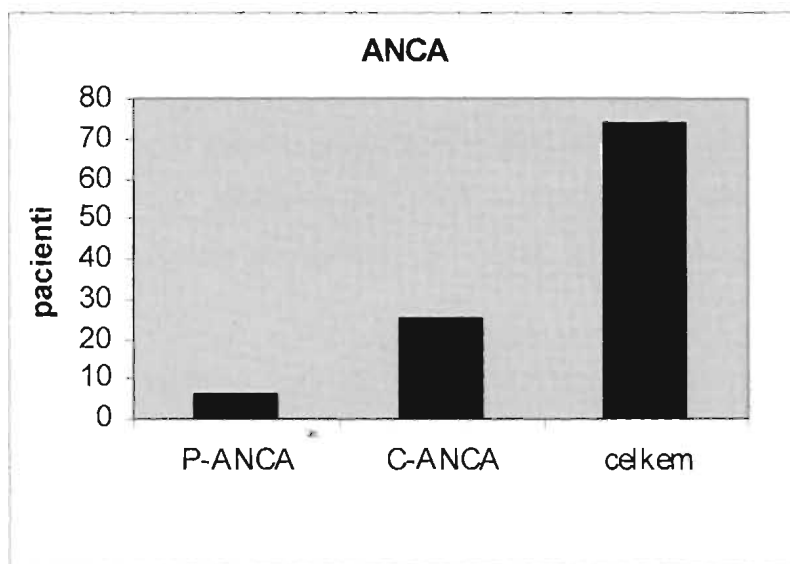
Použitá souprava:

Anti BPI - Mediagnost, Reutlingen, Německo.

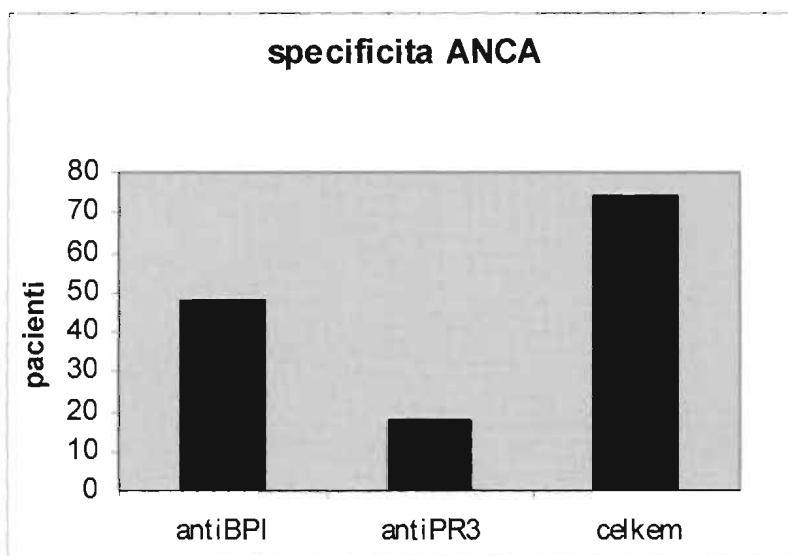
Anti -PR3 – Euroimmun A6, Lübeck, Německo

4.4.2 Výsledky vyšetření ANCA

Ze 74 vyšetřených dětí byla nalezena 6x pozitivní P-ANCA, 25x pozitivní C-ANCA. Při specifikaci v testu ELISA jsme našli ve 48 případech pozitivitu vůči BPI, v 18 případech pozitivitu vůči PR3, vše z celkem 74 vyšetřených dětí.



Graf č. 13 - Pozitivita ANCA ve fluorescenčním vyšetření.

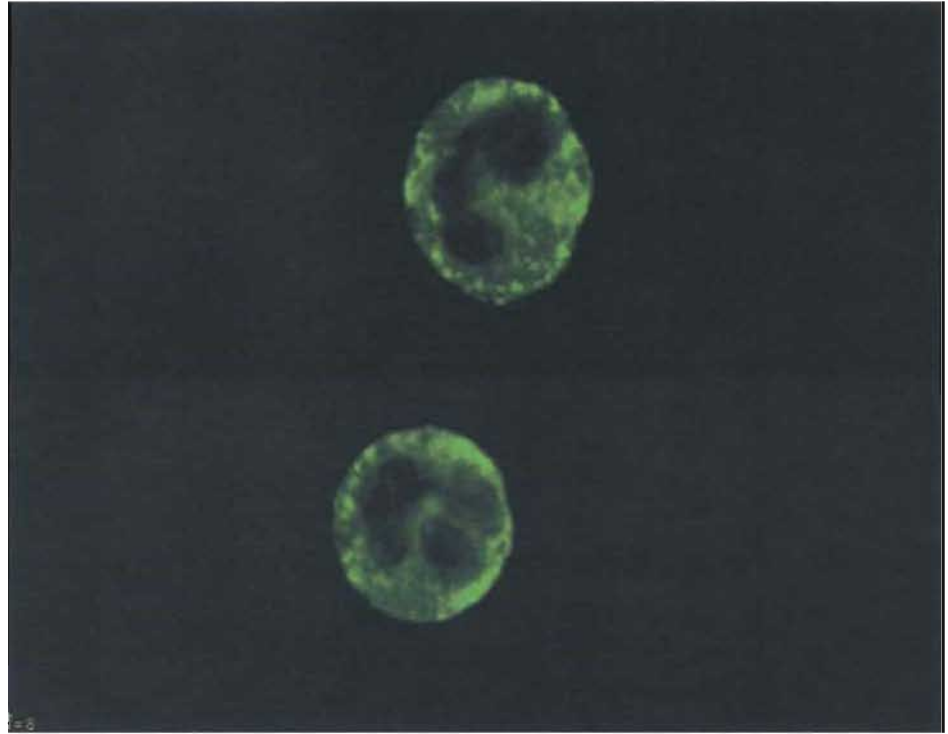


Graf č. 14 - Specifická ANCA při vyšetření ELISA.

4.4.3. Diskuse k vyšetření ANCA

U souboru vyšetřovaných dětí s CF byla opakovaně nalezena pozitivita ANCA protilátek, a to hlavně proti baktericidii permeabilitu zvyšujícímu proteinu. Patří do cytoplasmatických antigenů neutrofilů, který váže LPS. Má výrazné antimikrobiální účinky proti gram-negativním bakteriím. Auto protilátky proti BPI jsou nalézány u chronických intestinálních onemocnění, např. u ulcerativní kolitidy.

Zásadní otázka, jak k plicní infekci přispívají nalézané ANCA protilátky, nebyla dosud zodpovězena. ANCA protilátky v testech *in vitro* negativně ovlivňují funkce neutrofilů (26), jejich význam *in vivo* je dosud ve stadiu zkoumání.



C-ANCA , cytoplasmatický typ fluorescence

V. DISKUSE

Imunitní systém hraje zásadní úlohu v obraně proti infekci. Stejně důležitý je u pacientů s cystickou fibrózou, i když v tomto případě jsou u plicní infekce zásadní faktory lokálního prostředí plic ovlivněného základní nemocí, jež přispívají k chronické, celoživotně trvající infekci hlavně kmeny *Pseudomonas* a *Burkholderia cepacia* (14,2). Úloha imunitního systému u dětí s CF byla sice zkoumána, nicméně protože nebyla nalezena žádná primární imunodeficiencie, jež by mohla přispívat k průběhu onemocnění, není žádná forma imunoterapie v základních návrzích na terapii této choroby. V této práci byl sledován vývoj spektra imunoglobulinů u dětí. Bylo nalezeno snížení imunoglobulinů u dětí pod 10 let věku s následnou hypergamaglobulinémií, která patrně souvisí s prodělanými infekcemi. V další části práce bylo nalezeno v jednotlivých věkových skupinách snížení IgG2. Při srovnání s normálními hodnotami imunoglobulinů vzhledem k věku není toto snížení, stejně tak jako nižší IgG celkové statisticky významné, nicméně trend rozvoje IgG2 od nízkých hodnot do typické hypergamaglobulinemie je jasně patrný. Zajímavým faktem, týkajícím se právě imunoglobulinu IgG2, je skutečnost, že jako jediný z izotypů imunoglobulinů je pod vlivem Th1 větve imunitní odpovědi. Nabízí se otázka, zda defekt imunity není u pacientů s CF hlubší a zda snížení IgG2 není odrazem dysfunkce protektivní větve Th1 reakce. IgG2 má zásadní úlohu v obraně proti mikroorganismům s polysachridovými antigeny. Byla zjištěna jeho role v obraně právě proti kmenům *Pseudomonas* (7). Je tedy otázkou, zda přistoupit k substituční terapii imunoglobuliny v prvních letech života, kdy je zjištěn deficit IgG2 a ještě nedošlo k infekci, jejíž charakter je u dětí s CF obzvláště závažný a většinou se jedná o chronickou celoživotní infekci bez možnosti eradikace mikroorganismu.

Zásadní otázka, jak k plicní infekci přispívají nově nalézané ANCA protilátky, nebyla dosud zodpovězena. ANCA protilátky v testech *in vitro* negativně ovlivňují funkce neutrofilů (26), jejich význam *in vivo* je dosud ve stadiu zkoumání. V souboru vyšetřovaných dětí byla opakovaně nalezena pozitivita ANCA protilátek, a to hlavně proti baktericidii/permeabilitu zvyšujícímu proteinu. Vzhledem k tomu, že se jedná o významnou součást baktericidní výbavy neutrofilů a hlavní složku obrany proti lipopolysacharidu,

invazivnímu faktoru právě kmenů *Pseudomonas* (3) , měla by případná vazba a neutralizace BPI protilátkami proti této substanci výrazně negativní vliv na tyto chronické infekce. BPI-ANCA byla nalezena již u nejmenších dětí, kde by mohly mít vliv na kolonizaci plic patogenními kmeny *Pseudomonas*. Naproti tomu protilátky ANCA namířené proti proteináze 3 (PR3), dalšímu z baktericidních působků neutrofilů, nacházíme pouze u menší části dětí a v nízké koncentraci. Tyto protilátky jsou nejspíše důsledkem léta trvající infekce s významnou účastí neutrofilů a v počátcích onemocnění nehrají žádnou úlohu.

U pacientů s CF, stejně tak jako u zdravých jedinců, funguje imunitní systém jako souhrn regulovaných imunitních reakcí, které jsou zahájeny složkami vrozené imunity a následovány reakcemi specifických složek imunitní odpovědi. Většina změn v imunitním systému CF pacientů jsou pravděpodobně dány sekundárně a dochází k nim v průběhu onemocnění.

VI. ZÁVĚR

Imunitní systém u pacientů s CF je podle všech známek při narození plně funkční, bez prokazatelné patologie. Následně s průběhem onemocnění se rozvine řada sekundárních změn popsaných výše. Ve většině případů není nutná imunologická terapeutická intervence, s výjimkou substituce imunoglobulinů, hlavně v prvních měsících života. Přesto, že jedním z klíčových klinických příznaků CF je chronická infekce a účast imunitního systému je tedy zásadní, ukazuje se, že jeho poruchy jsou až sekundární a ovlivnění imunitních funkcí při tomto onemocnění má jenom pomocnou úlohu. Nicméně teoretické poznatky o interakci imunitního systému s infekčními patogeny v modifikovaném CF prostředí jsou velmi zajímavé a nové poznatky jak o CF, tak o funkci imunitního systému přinesou jistě v budoucnu nové pohledy na patogenezu a léčbu tohoto závažného onemocnění.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In: Schriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases.*: Mc Graw Hill; 1995. p. 3799-3875.
2. Berger M, Konstan M. Immunopathogenesis of Cystic Fibrosis Lung Disease. In: Yankaskas JR KM, editor. *Cystic Fibrosis in Adults.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p. 115-143.
3. Döring G, Bellon G, Knight R. Immunology in cystic fibrosis. In: Hodson M, Geddes, DM, editor. *Cystic Fibrosis.* 2nd ed. London: Arnolds; 2000. p. 109-140.
4. Bals R, Weiner DJ, Wilson JM. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 1999;103(3):303-7.
5. Vávrová, V. a kol.: *Cystická fibróza v praxi.* 1. vyd. Praha, nakl. Kreace s. r. o., 1999, 152 str.
6. Hájek, Z., Kulovaný, E., Macek, M.: *Základy prenatální diagnostiky.* 1. vyd. Praha, nakl. Grada, 2000, 424 str.
7. Vávrová, V. a kol.: *Cystická fibróza.* 1. vyd. Praha, nakl. Grada, 2005, 520 str.
8. Bednář, M.: *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie.* 1. vyd. Praha, nakl. Marvil, 1996, 558 str.
9. Příručka o cystické fibróze pro pacienty a jejich rodiče. Překlad publikace vydané European Thematic Network for Cystic Fibrosis, české vydání s podporou Astra Zeneca 2001.
10. Vávrová, V. a kol.: *Cystická fibróza na počátku 21. století.* *Vox pediatrice*, 2, 2002, č.9, str. 26-28
11. Dřevínek, P., Hrbáčková, H., Cinek, O., Bartošová, J., Nyč, O., Nemeč, A., Pohunek, P.: Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(9). 3485-3488.
12. Aarbiou J, Rabe KF, Hiemstra PS. Role of defensins in inflammatory lung disease. *Ann Med* 2002;34(2):96-101.
13. Chen CI, Schaller-Bals S, Paul KP, Wahn U, Bals R. Beta-defensins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004;3(1):45-50.

14. Pier GB GM, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94::12088-12093.
15. West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. Crit Care Med 2002;30(1 Supp):S64-S73.
16. Elsbach P. Mechanisms of disposal of bacterial lipopolysaccharides by animal hosts. Microbes Infect 2000;2(10):1171-80.
17. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. Curr Opin Immunol 2003;15(4):396-401.
18. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol 2001;2(8):675-80.
19. Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. J Clin Invest 1999;104(4):431-7.
20. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. Biochim Biophys Acta 2002;1572(2-3):401-13.
21. Šedivá A, Vávrová, V, Bartošová, J, Pohunek, Bartůňková, J, Macek, M. Immune Aspects of Cystic Fibrosis. ACI International 2001;13(2):67-70.
22. Lucidi V, Fiore L, Caniglia M, Rosati P, Novello F, Papadatou B, et al. Poliomyelitis and tetanus immunization: antibody responses in patients with cystic fibrosis. Pediatr Infect Dis J 1996;15(10):914-6.
23. Skov M, Pandey JP, Pressler T, Hoiby N, Koch C. Immunoglobulin allotypes and IgG subclass antibody response to *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros 2004;3(3):173-8.
24. Kilpatrick D. Introduction to mannan-binding lectin. Biochem Soc Trans 2003;31(4):745-7.
25. Moss, R.B., Hsu, Y.P., Van Eede, P.H., Van Leeuwen, A.M., Lewiston, N.J., De Lange, G.: Altered antibody isotype in cystic fibrosis: impaired natural antibody response to polysaccharide antigens. Pediatr Res 22(6) 1987, s. 708-13.
26. Bartůňková, J, Araujo, A, Hrušák, O, Šedivá, A. Autoimmunity to polymorphonuclears: functional consequences of the binding of antibodies to membrane and cytoplasmic target antigens of polymorphonuclear leucocytes. J Clin Immunol, 17(6) 1997, s. 455-61.

27. Pier, G.B.: Rationale for development of immunotherapies that target mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. Behring Inst Mitt (98) 1997, s.350-60.
28. Elsbach, P.: Role of bactericidal/permeability increasing protein in host defence. Curr opin Immunol 10(1)1998, s. 45-9.

POUŽITÉ OBRÁZKY

Str. 10 <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/genelocation>

Str. 11,13,14 z osobního archivu RNDr. Eduarda Kočárka

Str. 35,36 firemní materiál firmy Immunotech