

Interpretace sérologických a molekulárně biologických vyšetření u infekcí dětí

Mgr. Pavel Sauer, Ph.D.¹, Mgr. Renata Večeřová, Ph.D.¹, Mgr. Taťána Štosová, Ph.D.¹

¹Ústav mikrobiologie FN Olomouc a LF UP v Olomouci

Možnosti sérologických a molekulárně biologických vyšetřovacích metod v mikrobiologii s sebou přináší na jednu stranu rozšíření spektra detekovaných patogenů a výrazné urychlení záchytu, na druhou stranu je interpretace výsledků provázána řadou úskalí. Článek se snaží popsat základní podstatu, možnosti a využití jmenovaných metod detekce s přihlédnutím na různé nástrahy interpretace.

Klíčová slova: mikrobiologie, interpretace, sérologické metody, molekulárně biologické metody.

Interpretation of serological and molecular biological detections in infections of children

The possibilities of serological and molecular-biological microbiological examination methods, on the one hand, extend the spectrum of detected pathogens and significantly accelerate pathogen capture, but on the other hand, the interpretation of results is accompanied by a number of pitfalls. This article tries to describe the basic nature, possibilities and use of the mentioned methods of detection, taking into account various pitfalls of interpretation.

Key words: microbiology, interpretation, serological methods, molecular-biological methods.

Úvod

Mikrobiologické vyšetřovací metody umožňují přímý i nepřímý průkaz infekce. Při přímém průkazu infekce ve vyšetřovaném biologickém vzorku prokazujeme konkrétní mikroorganismus (virus, bakterii, houbu, parazita), jeho antigenní determinantu nebo nukleovou kyselinu. Mezi metody přímého průkazu řadíme mikroskopii, kultivaci, sérologický průkaz specifického antigenu či přítomnost nukleové kyseliny (molekulárně biologické metody). Pozitivní nález ovšem neznamená, že zjištěný mikroorganismus je etiologickým agens infekce. Může se jednat o kolonizujícího mikroba nebo o kontaminaci biologického vzorku. Pouze kultivační metody nám potvrdí, jedná-li se o živé agens, umožní sledovat fenotypové vlastnosti vykultivovaného kmene a určit jeho citlivost k antimikrobním látkám. Pro všechny metody přímé detekce v biologickém materiálu je základní podmínkou úspěšné diagnostiky správně

provedený odběr. Nesprávný odběr materiálu, jeho nevhodné skladování, či transport do laboratoře vede k neplatným a zavádějícím výsledkům. Při nepřímém průkazu infekce hodnotíme specifickou imunitní odpověď organismu, kterou vyvolal konkrétní infekční činitel. Volba vhodné vyšetřovací metody závisí na klinických příznacích infekce a na anamnéze pacienta. Výsledek mikrobiologického vyšetření pacienta je možno interpretovat pouze v kontextu s ostatními laboratorními a klinickými nálezy (1, 2).

Sérologické vyšetřovací metody a jejich interpretace

Sérologická reakce je definována jako specifická reakce mezi antigenem a protilátkou a využíváme ji v laboratorní diagnostice infekčních nemocí pro přímý průkaz infekčního agens (antigenu) i pro nepřímý průkaz infekce (protilátek) (3, 4).

Přímý průkaz využívá specifickou protilátku k potvrzení přítomnosti konkrétního antigenu v biologickém materiálu. Této metody využíváme např. při diagnostice hepatitidy B – detekce antigenů HBsAg a HBeAg, u HIV prokazujeme p24 antigen. Významným pomocníkem při diferenciální diagnostice bakteriálních meningitid je aglutinační reakce s antigeny nejčastějších bakteriálních původců přímo v likvoru (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*).

Přímého průkazu antigenů využívají také imunochromatografické testy označované jako rychlotesty nebo clearview testy. Soupravy lze pro jejich jednoduchost a rychlost použít přímo v ambulanci nebo u lůžka pacienta bez nutnosti odesílat biologický materiál do laboratoře. Nicméně spolehlivost rychlotestů je omezená a citlivost se nevyrovná enzymovým nebo molekulárně biologickým metodám. Jako konkrétní příklad

můžeme uvést průkaz antigenu *Streptococcus pneumoniae* nebo *Legionella pneumophila* v moči, *Streptococcus pyogenes* ve výtěru z krku, adenoviry, noroviry, rotaviry ve stolici, atp.

Při nepřímém průkazu infekčního agens detekujeme specifické protilátky pomocí známých antigenů. Protilátky se v makroorganismu tvoří jako imunitní odpověď na stimulaci antigenem. Interpretace výsledků sérologických reakcí může být svízelná a často nemůže klinikovi poskytnout jednoznačný závěr bez posouzení všech souvislostí a klinického stavu. Nutností je ve většině případů sledování dynamiky imunitní odpovědi.

Mikrob po vniknutí do organismu vyvolá imunitní reakci, která mimo jiné vede k produkci specifických protilátek. Pro diagnostiku infekčních stavů můžeme stanovit celkové protilátky nebo imunoglobuliny jednotlivých tříd (IgM, IgA a IgG). Jako první se začínají tvořit protilátky s nízkou afinitou a specificitou – IgM protilátky. Postupným laděním imunitní reakce dochází k izotypovému přesmyku a začínají se tvořit vysoce afinitní IgA a IgG. Celková stabilita komplexu protilátky a antigenu je vyjádřena aviditou. Vysoká avidita imunoglobulinů je známkou infekce proběhlé před delší dobou. Průkaz akutní infekce pomocí nízké avidity protilátek je nespolehlivý. IgM protilátky po skončení infekce postupně mizí, zůstávají anamnestické IgG. Nález IgM ale ne vždy svědčí pro právě probíhající infekci. Při prudké aktivaci imunitního systému nebo při poruše regulačních mechanismů se můžeme setkat s polyspecifickou produkcí IgM. Díky nízké specificitě IgM protilátek a jejich zkřížené reaktivitě s podobnými antigenům můžeme nespecifickou IgM reaktivitu zachytit v celé řadě sérologických testů. S interpretací opět pomůže odběr párového vzorku a sledování dynamiky imunitní odpovědi.

Stejně tak při aktivaci latentních infekcí, chronických perzistujících infekcích a reinfekcích mohou hladiny IgM kolísat a je obtížné pomocí jednoho vyšetření hodnotit stadium infekce.

Výsledek sérologického vyšetření protilátek bývá udáván kvalitativně (pozitivní, negativní, případně hraniční), semikvantitativně (index positivity, poměr S/CO = srovnáním s hraničním cut off vzorkem) nebo kvantitativně (číselná hodnota + jednotka, např. U/l, titr protilátek). Je-li pro vyšetřovanou položku stanovený mezinárodní

standard, lze výsledek udávat v mezinárodních jednotkách nebo jejich ekvivalentech (IU/l). Srovnávací standardy nejsou pro většinu analytů dostupné, jednotlivé soupravy různých výrobců využívají jiných antigenních determinantů, a to je důvodem, proč se výsledky sérologických vyšetření jednotlivých laboratoří mohou lišit a jsou mezilaboratorně nesrovnatelné.

Vyšetření párového vzorku je pro kvalitní interpretaci sérologického vyšetření nutností, nicméně časová prodleva mezi vyšetřeními často pouze potvrdí etiologické agens u již rekonvalescentního pacienta. Sledování dynamiky tvorby protilátek je jednodušší u titračních metod, kdy se vyšetřované sérum ředí geometrickou řadou a hodnotí se titr protilátek. Signifikantním nálezem je minimálně 4 násobný vzestup titru protilátek v párovém séru. Hodnocení dynamiky tvorby protilátek u značených metod je možné, je-li výsledek kvantifikován. U kvalitativních/semikvantitativních hodnocení se musíme spokojit se sérokonverzí jednotlivých tříd imunoglobulinů.

Úskalí interpretace sérologické diagnostiky

Interpretace sérologické diagnostiky má řadu obtíží. Na metody nepřímého průkazu nelze spoléhat v časně fázi onemocnění. Nástup specifické imunitní odpovědi trvá několik dnů až týdnů (diagnostické okno) dle typu infekce, proto při akutních stavech negativní průkaz protilátek nevylučuje infekci a při přetrvávajícím podezření je potřeba opakovat vyšetření s časovým odstupem.

Při masivním vyplavení mikrobů do krevního oběhu může dojít k dočasnému vyvázání protilátek do imunokomplexů, a tedy k paradoxnímu snížení hladin stanovených volných protilátek.

U osob s nedostatečně vyvinutou nebo suprimovanou imunitou se na výsledky průkazu protilátek nemůžeme spolehnout. Vždy je vhodné vyšetření doplnit metodou přímého průkazu infekčního agens.

Při interpretaci sérologických výsledků musí být rovněž zohledněna specifika dětského věku, která vyplývají především z postupného vyžívání imunitního systému. U novorozenců a kojenců do cca 6 měsíců se můžeme setkat s nálezem imunoglobulinů třídy IgG, které byly získány od matky transplacentárním přestupem. Ostatní třídy imunoglobulinů přes placentu neprocházejí. Mateřské IgG protilátky mají funkci

opsoninů pro většinu gram pozitivních bakterií a rovněž jsou dostatečnou ochranou proti běžným virovým infekcím. I u nezralých dětí se po stimulaci antigenem zevního prostředí tvoří nejprve IgM protilátky. Nezralý imunitní systém tvoří protilátky v menším množství, a také se netvoří celé spektrum známých protilátek. Od narození je organismus schopen vytvářet protilátky proti proteinovým antigenům, ale proti polysacharidovým až od 2 let. Celková hladina protilátek je nejnižší kolem 3–4 měsíce věku (2).

Gravidita vyžaduje navození imunologické tolerance matčina organismu vůči plodu zasahující do celého imunitního systému. Důsledkem je vyšší počet nespecifických sérologických nálezů u těhotných žen.

Po očkování se mohou krátkodobě vyskytnout v nízkých hladinách imunoglobuliny třídy IgM, a poté ve vyšších hladinách IgG. Pokud onemocní očkovaný jedinec, profil zachycených protilátek naopak nemusí obsahovat IgM, ale zaznamenáme pouze významný vzestup IgG, což lze vysledovat opět pouze vyšetřením párového vzorku.

Molekulárně biologické metody a jejich interpretace

Molekulárně biologické metody v mikrobiologii patří mezi metody přímého průkazu – jde o detekci nukleové kyseliny (DNA, RNA) pomnožením (amplifikací) specifického úseku pro daný patogenní mikroorganismus, nejčastěji real-time polymerázovou řetězovou reakcí. To přináší výhodu vysoké citlivosti, rychlosti provedení a možnosti kvantifikace (virová nálož). Jmenované metody jsou cíleny převážně na nekultivovatelné (viry), popř. pomalu rostoucí mikroorganismy (např. *Mycobacterium tuberculosis*). První a dnes běžně využívanou oblastí pro tyto metody je průkaz původců respiračních infekcí, velký benefit přináší také v diagnostice meningitid a hepatitid, kde je mj. kvantitativní stanovení virémie nedílnou součástí algoritmu moderní léčby.

Příklady molekulárně biologických a sérologických vyšetření

Respirační infekce

V diagnostice infekcí respiračního traktu hraje primární roli rozlišení bakteriálního nebo virového původce. Proto první místo stále zaujímá bakte-

riologická kultivace pro nalezení bakteriálního agens odpovědného za infekci spolu s určením jeho citlivosti k antibiotikům. Při interpretaci nálezu je potřeba uvažovat nad kvantitou výskytu daného agens v poměru k fyziologické flóře a odlišit tak kolonizaci a nosičství od patologické role mikroorganismu. Metody molekulární biologie a sérologie většinou nastupují až v druhé linii, tedy tehdy, pokud odpovídající bakteriální původce není nalezen a lze předpokládat virovou etiologii infekce (např. při mononukleóze) nebo jedná-li se např. o infekci během sezóny respiračních infekcí (chřipková sezóna), kdy je virový původ infekce očekáván. Přínos molekulárně biologického průkazu zde má většinou větší váhu než detekce protilátek. Nespornou výhodou je také možnost souběžného zachytu více patogenů z jednoho odebraného vzorku (při tzv. multiplex PCR detekci je běžné prokazovat až pět patogenů během jedné detekce). Jedná se hlavně o záchyt respiračních virů (chřipkové, RSV = respirační syncytiální virus, adenovirus, viry parainfluenzy) a dále pak hůře kultivovatelných bakterií (často označovaných jako původci atypických pneumonií): *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*. Interpretace nálezů bývá jednoznačná – pozitivní záchyt hovoří o přítomnosti daného patogenu v lokalitě, z níž byl odebrán biologický vzorek. U negativního záchytu je situace složitější – je potřeba se zamyslet nad tím, zda byl odběr proveden správně, ze správné lokality a v optimální čas, což může velice významně ovlivnit kvantitu patogenu v odebraném materiálu. Důležité je také, zda bylo odebráno dostatečné množství materiálu, což může být například u nespupracujícího dítěte obtížné. Třetím interpretačním výsledkem je inhibice, kdy laboratoř nemůže rozhodnout o přítomnosti/nepřítomnosti mikroorganismu ve vzorku vzhledem k tomu, že samotná detekce (PCR reakce) je inhibována neznámou komponentou z biologického vzorku a i při přítomnosti mikroorganismu by byl výsledek detekce negativní. Inhibitorů je známa celá řada (např. hemoglobin, polysacharidy, léky) a nelze jednoduše rozhodnout, který z nich inhibici stojí (5). Většinou je lékař požádán o opakovaný odběr biologického vzorku.

V praxi molekulárně biologickými technikami běžně probíhá bezproblémový záchyt chřipkových virů (většina testů nabízí i jejich určení do podtypů, což je důležité pro epidemiologickou

situaci dané chřipkové sezóny), viru spalniček, RSV, původce černého kašle – *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* z výtěru z nosohltanu, sputa nebo bronchoalveolární laváže. U bordetel se molekulárně biologický průkaz začal považovat za standard, přičemž nutnost kultivace už dnes většinou odpadá (6). Detekce *Legionella pneumophila* nemá v případě dětského pacienta přílišné opodstatnění. K nabídce možnosti molekulárně biologické detekce bakterií, které se mohou běžně v lokalitě nosohltanu a respiračního traktu vyskytnout (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus sp.*) je třeba přistupovat opatrně, vzhledem k obtížné interpretaci výsledku (přítomnost bakterie versus neznámá kvantita prokázané bakterie). V těchto případech je vysoká citlivost PCR metod naopak nevýhodou.

U většiny bakteriálních infekcí je dobré diagnózu podpořit i sérologickým průkazem protilátek, přičemž je potřeba pomýšlet na jejich opožděný nástup. Při odeznívající infekci naopak může antigen (nukleová kyselina) již vymizet a mohou přetrvávat jen protilátky. Běžná je souběžná PCR detekce nukleové kyseliny a sérologický průkaz protilátek proti *Mycoplasma pneumoniae* (IgM, IgG), *Bordetella pertussis* (IgA, IgG). Oba výsledky průkazu se navzájem doplňují. U dětských pacientů je potřeba počítat s protilátkovou odezvou navozenou očkováním acelulární vakcínou proti bordetelovému toxinu. Vyšetření protilátek je nespolehlivé 1 rok po vakcinaci. Molekulárně biologická detekce intracelulární *Chlamydia pneumoniae* je problematická, stejně tak jako interpretace sérologického nálezu.

Neuroinfekce

V případě neuroinfekcí molekulární biologie výborně doplňuje časnou diagnostiku před tím, než je bakteriální původce z likvoru vykultivován. PCR detekce je zpravidla prováděna souběžně s prvotními metodami průkazu (mikroskopii, aglutinačním průkazem antigenů) a může tak urychlit diagnostiku až o 12 hodin oproti kultivaci. Mezi nejčastěji prokazované patogeny patří *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* v kombinaci s enteroviry, HSV a varicella – zoster viru (VZV).

Při laboratorní diagnostice neuroinfekcí způsobených virem klíšťové encefalidity (KME) a boreliemi je nepostradatelné sérologické

vyšetření krve (KME) i likvoru (borelie). Virus klíšťové encefalidity lze pomocí PCR zachytit pouze v časně fázi onemocnění, kdy ještě nejsou neurologické příznaky manifestovány. Pozitivita PCR borelií v likvoru při prokázané neuroborelióze je asi jen 30 % (7). Pro posouzení intratekální produkce protilátek je nutné vypočítat Index protilátek (antibody index, CSQ koeficient, Reiberův koeficient), který zohledňuje stav a funkci hematoencefalické bariéry a umožňuje posoudit, zda se protilátky tvoří v kompartmentu CNS nebo prostoupily z krve. Vyšetřování protilátek proti ostatním neurotropním virům v likvoru má větší význam pro diagnostiku imunopatologických stavů než pro určení akutní fáze neuroinfekce. V časně fázi infekce se specifické protilátky v likvoru netvoří v detekovatelném množství.

Vybrané herpetické infekce

V současné době je známo osm lidských herpetických virů. Většina primární infekcí herpetickými viry u dětí probíhá s jasnými klinickými projevy bez nutnosti laboratorní diagnostiky a léčby. Projevy nakonec samy odezní, ale herpetické viry setrvávají v organismu po celý život.

Virus Epstein-Barrové (EBV)

První setkání s virem Epstein-Barrové zaznamenáváme u většiny populace již v dětském věku. Primoinfekce probíhá většinou asymptomatically nebo pouze s mírnými příznaky běžnými pro jiná virová onemocnění. V období adolescence a časně dospělosti se primoinfekce prezentuje pod obrazem infekční mononukleózy. Mezi klinické projevy patří zejména horečka, lymfadenopatie, faryngitida, splenomegalie, hepatomegalie. K ústupu klinických příznaků dochází ve druhém týdnu nemoci. Únava a malátnost však může přetrvávat několik týdnů (8).

Laboratorní diagnostika se opírá zejména o detekci specifických protilátek proti virovým strukturálním proteinům VCA (Viral Capsid Antigen), nestrukturálním proteinům, které jsou exprimovány během lytické fáze – EA (Early Antigen) a v neposlední řadě proti nukleárním proteinům, exprimovaným při latentní fázi EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen). Pacienti s poruchami imunity mohou tvořit abnormálně vysoké či naopak nízké titry specifických protilátek. Protilátky proti EBNA nemusí tvořit vůbec (9).

Vyšetření pouze jednoho vzorku séra u dětí může vést k nejednoznačnosti interpretace výsledků. Pro akutní EBV infekci je charakteristická pozitivita VCA IgM, která přetrvává 4–8 týdnů. Protilátky proti EA se objevují 3–4 týdny po prvních příznacích a perzistují 2–4 měsíce. Protilátky proti EBNA jsou prokazatelné při latentní infekci a společně s VCA IgG přetrvávají celý život. Známkou reaktivity infekce je pozitivita VCA IgM a protilátek EA a EBNA (9).

Přechod do chronicity je charakterizován vysokými titry VCA IgG, EA IgG a pozitivitou VCA IgM. Během této fáze onemocnění může docházet k zánětlivému poškození různých tkání a orgánů. Při interpretaci serologických výsledků musíme myslet i na možnost zkřížené reaktivity IgM protilátek proti ostatním herpetickým virům.

Metody založené na real-time polymerázové řetězové reakce umožňují kvalitativní i kvantitativní detekci EBV. Jsou výhodou na začátku onemocnění, kdy zejména u dětí nemusí být patrné jednoznačné klinické příznaky a protilátky ještě nejsou detekovatelné. V případě kvantitativního stanovení virové nálože v několika vzorcích s časovým odstupem je možné sledovat aktivitu viru a odlišit akutní virémii od krátkodobé spontánní replikace (10). To je využíváno zejména u imunokompromitovaných pacientů s onkologickým onemocněním nebo po transplantacích.

Cytomegalovirus (CMV)

Lidský cytomegalovirus (CMV) je zcela běžným lidským patogenem. Rozlišujeme cytomegalovirovou infekci vrozenou a získanou. Získaná infekce u imunokompetentního hostitele probíhá inaparentně. Výjimečně vyvolá obraz podobný infekční mononukleóze s atypickými lymfocyty a zvýšenými jaterními transaminázami (11).

Zduření uzlin je nevýrazné, chybí povlaková angína, spíše je přítomna faryngitida (8). Diagnostika primoinfekce se opírá o průkaz specifických protilátek IgM. Posléze nastupují IgG protilátky, které přetrvávají celoživotně. Při reinfekci nebo reaktivaci infekce nemusí dojít k produkci IgM protilátek, diagnostickým znakem je výrazná dynamika odpovědi ve třídě IgG.

V případě CMV je třeba zmínit i možnou reaktivaci cytomegalovirové infekce séropozitivních gravidních žen a následnou kongenitální infekci plodu. Po narození se jedná o asymptomatické děti s kongenitální infekcí, u kterých se mohou vlivem aktivní cytomegalovirové infekce postupně rozvinout dlouhodobé následky v podobě sensorineurální ztráty sluchu nebo kognitivní poškození, a to až během dětství. Kongenitální CMV je možné přímo detekovat metodou PCR z neinvazivních materiálů jako je moč nebo sliny již u novorozenců v průběhu prvních 2–3 týdnů života, aby se odlišila vrozená a postnatálně získaná CMV infekce. Do moči se u dětí virus může uvolňovat řadu měsíců až let. Postnatální infekci je možné léčit příslušnými antivirovými a příznivě ovlivnit sluchové a vývojové výsledky (12).

Parvovirus B19

Infekce parvovirem B19 probíhá zpravidla asymptomaticky. U dětí se projevuje charakteristickým exantémem na tvářích (8). V první fázi nákazy vzniká virémie, provázená horečkou a chřipce podobnými příznaky. Asi po 2 týdnech, v době odpovídající narůstající hladině protilátek, se objeví kožní exantém a mohou se vyskytnout i revmatické potíže. Z dalších komplikací jsou známy myokarditida, hepatitida a neuropatie. Je pravděpodobné, že tyto projevy infekce par-

vovirem B19 jsou následkem vzniku a ukládání imunokomplexů do kůže a dalších oblastí v těle.

Parvovirus napadá prekursor erytrocytů v kostní dřeni. Při poruchách imunity se může rozvinout chronická aplazie kostní dřene a život ohrožující anémie. U zdravých jedinců se útlum erythropoézy neprojevuje. Intrauterinní infekce může přivodit závažnou anémii a asfyxii plodu i novorozence (8).

Laboratorní průkaz infekce spočívá v detekci protilátek a DNA viru. Téměř ve všech případech obrazu infekce se najdou specifické protilátky třídy IgM. Tyto protilátky přetrvávají 2–3 měsíce po akutní infekci. Vyšetřování specifických protilátek typu IgG je mnohem méně užitečné, protože u většiny lidí je velká variabilita jejich přítomnosti a výše hladin (13).

Rovněž pro diagnostiku parvoviru B19 jsou v současné době rovněž využívány zejména molekulárně-biologické metody založené na PCR. Bylo totiž zjištěno, že na prognózu pacienta nemá zásadní vliv jen vlastní časná detekce viru v krvi, ale také iniciální hodnota a dynamika nárůstu virové nálože (závislá např. na rychlosti replikace) (14). Kvantitativní monitorování také umožňuje sledování odpovědi na léčbu a v případě použití jiných vzorků než periferní krev (např. tkáň) také odlišení lokální reaktivity od aktivní infekce.

Závěr

Interpretace sérologických a molekulárně biologických vyšetření má, zvláště u dětí, svá specifika, na která je při vydávání výsledků třeba pomyslet. Je nutná korelace s dalšími laboratorními markery, brát na zřetel druh infekčního agens, klinický stav, věk a anamnézu pacienta.

LITERATURA

1. Roubalová K. Laboratorní diagnostika herpetických virů. *Med. Pro Praxi* 2010; 7 (5): 241–244.
2. Votava M. Serologická vyšetření a interpretace serologických nálezů. *Pediatr. praxi* 2004; 5 (2) 75–79.
3. Hořejší V, Bartůňková J, Brdička T, Špišák R. *Základy imunologie*. Praha: Triton 2019: 304s.
4. Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus 2004: 941s.
5. Wiedbrauk DL et al. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 2643–2646.
6. Fabiánová K, Zavadilová J. Aktualizovaná doporučení pro

- laboratorní diagnostiku pertuse a parapertuse, *Zprávy CEM (SZÚ, PRAHA)* 2011; 20(4).
7. Mygland A, Ljostad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur. J. Neurol.* 2010; 17: 8–16.
8. Beneš J. *Infekční lékařství*. Praha: Galén: 2009: 651s.
9. Ambrožová H. Infekční mononukleóza. *Postgraduální medicína* 2009; 11 (6): 24–27.
10. Sugden B, Rickinson AB, Kieff E. *DNA Viruses – Herpesviruses II (EBV)*. *Sem. Virol.* 1994; 5: 197–205.
11. Votava M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Nep-tum 2003: 495s.
12. Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection, *Seminars in perinatology* 2018; 42: 149–154.
13. Young NS, Brown KE, Parvovirus B19 N. *Engl J. Med.* 2004; 350 (6): 586–597.
14. Munoz-Cobo B, Solano C, Costa E. et al. Dynamics of CMV plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic SCT setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 1602–1611.