

# KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE A INFEKČNÍ LÉKAŘSTVÍ

Interdisciplinární časopis vydávaný pod záštitou  
Společnosti infekčního lékařství, Společnosti pro lékařskou mikrobiologii  
a Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

## REDAKČNÍ RADA

### Šéfredaktor

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.  
Ústav mikrobiologie FNOL a LF UP v Olomouci

### Zástupci šéfredaktora

Doc. MUDr. Stanislav Plíšek, Ph.D.  
Klinika infekčních nemocí LF UK a FN Hradec Králové  
Doc. MUDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA  
Státní veterinární ústav, Olomouc

### Redakční rada

Prof. MUDr. Jiří Beneš, CSc.  
Infekční klinika 3. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Praha  
Prof. MUDr. Jiří Beran, CSc.  
Centrum očkování a cestovní medicíny, Hradec Králové  
Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.  
Ústav klinické mikrobiologie LF UK a FN Hradec Králové  
Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.  
Odd. klinické mikrobiologie Thomayerova nemocnice, Praha  
MUDr. Pavel Dlouhý  
Infekční oddělení a AIDS centrum,  
Krajská zdravotní, a. s., Ústí nad Labem  
Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.  
Ústav mikrobiologie FNOL a LF UP v Olomouci  
Prof. MUDr. Petr Husa, CSc.  
Klinika infekčních chorob, LF MU a FN Brno  
RNDr. Dittmar Chmelař, Ph.D.  
NRL pro anaerobní bakterie, LF Ostravské Univerzity  
Doc. RNDr. Jarmila Jelínková, CSc.  
Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha  
Prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.  
Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK v Praze  
Prof. MUDr. Daniela Kotulová, Ph.D.  
Čestná členka Slovenskej spoločnosti klinickej  
mikrobiologie, SLS  
MUDr. Pavla Křížová, CSc.  
Státní zdravotní ústav, Praha  
MUDr. Roman Kula, CSc.  
Anesteziologicko-resuscitační klinika, FN Ostrava  
Ing. Mgr. Tomáš Látal  
TRIOS, spol. s r. o., Praha  
Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, Ph.D.  
Státní zdravotní ústav, Praha  
MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.  
Ústav lék. mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol, Praha  
MUDr. Hanuš Rozsypal, CSc.  
Infekční klinika 1. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Praha  
Doc. MUDr. Luděk Rožnovský, CSc.  
Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava  
MUDr. Josef Scharfen, CSc.  
Odd. lék. mikrobiol. a imunol. Oblast. nemocnice Trutnov  
Prof. MUDr. Ivan Schréter, CSc.  
Klinika pre infekčné choroby, LF UPJŠ, Košice  
Doc. MUDr. Anna Součková, CSc.  
Ústav lék. mikrobiologie 2. LF UK Praha  
Doc. MUDr. Marie Staňková, CSc.  
Infekční klinika 1. LF, Nemocnice Na Bulovce, Praha  
Doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.  
Ústav farmakologie, FN a LF UP v Olomouci  
Prof. MUDr. Miroslav Votava, CSc.  
Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně  
MUDr. Eva Zampachová  
Centrální laboratoře, laboratoř virologie, Nemocnice  
České Budějovice, a. s.



## VYDAVATEL

### a adresa redakce:

TRIOS, spol. s r. o.,  
Zakouňova 142, 149 00 Praha 4-Chodov  
Tel.: +420 267 912 030, Fax: +420 267 915 563  
redakce@trios.cz, http://kml.trios.cz  
Redakce: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.  
Mgr. Hedvíka Nevečeřalová

Inzerce: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Sazba: SILVA, s. r. o., Táborská 31, Praha 4  
Tisk: GRAFOTECHNA Plus, s. r. o.  
Lýskova 1594/33, 155 00 Praha 13-Stodůlky

## OBSAH

### ÚVODNÍK

L. Rožnovský

79

### PŮVODNÍ PRÁCE

#### Rychlá identifikace ESBL-pozitivních klinických vzorků metodou real-time PCR

M. Sittová, M. Dendis, Š. Dosoudilová, R. Horváth,  
M. Chromá, V. Husičková, K. Hricová, M. Kolář

80

#### Využití elektronové mikroskopie a izolace viru v diagnostice aseptických neuroinfekcí

L. Petroušová, L. Rožnovský, H. Zelená, M. Pomiklová,  
I. Vidličková, J. Mrázek

85

#### Zkušenosti s laboratorní diagnostikou *Clostridium difficile*

L. Bareková, E. Zálabská, I. Hanovcová

91

### PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

#### Trpasličí kmeny – Small colony variants *Staphylococcus aureus*

J. Tkadlec, O. Melter

96

#### Cytomegalovirus a jeho vztah k chronickým zánětům střev a nádorovým onemocněním

M. Fajfr, V. Štěpánová

103

### KAZUISTIKA

#### Primární meningokoková konjunktivitida s rozvojem invazivního onemocnění

L. Petroušová, L. Rožnovský

107

Časopis je indexován a excerptován v databázích Medline/Index Medicus,  
Embase/Excerpta Medica Database a Scopus.

Všechny příspěvky kromě zpráv a dopisů redakci procházejí nezávislou recenzí.

Vychází 4x ročně, roční předplatné 520,- Kč.

Povoleno Ministerstvem kultury ČR pod č. MK ČR 7352.

ISSN 1211-264X

Podávání novinových zásilek povolila Česká pošta, s. p., odštěpný závod Praha, čj. nov. 5449/95 ze dne 7. 12. 1995. Vydavatel nese odpovědnost za údaje a názory autorů jednotlivých článků nebo inzerce. Současně si vyhrazuje právo na drobné stylistické úpravy článků. Žádná část tohoto časopisu nesmí být bez předchozího písemného souhlasu vlastníka autorských práv kopírována a rozmnožována za účelem dalšího rozšiřování v jakémkoliv formě či jakýmkoliv způsobem (ať mechanickým, nebo elektronickým – včetně pořizování fotokopii, nahrávek či informačních databází).



# CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

Interdisciplinary journal published under the auspices  
of the Societies for Clinical Microbiology, for Epidemiology and Microbiology and for Infectious Diseases,  
Members of the Czech Medical Association of Jan Evangelista Purkyně

## EDITORIAL BOARD

### Editor in Chief

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.  
Department of Microbiology, Faculty of Medicine  
and Dentistry, Palacký University in Olomouc

### Editors

Doc. MUDr. Stanislav Plíšek, Ph.D.  
Department of Infectious Diseases, Univ. Hospital Hradec  
Králové and Fac. of Medicine Hradec Králové, Charles Univ.

Doc. MVDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA  
State Veterinary Institute, Olomouc

Prof. MUDr. Jiří Beneš, CSc.  
Dept. Infect. Dis. 3<sup>rd</sup> Med. Faculty, Charles Univ. Prague

Prof. MUDr. Jiří Beran, CSc.  
Vaccination Centre and Travel Medicine, Hradec Králové

Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.  
Dept. of Clinical Microbiology, Univ. Hospital Hradec  
Králové and Fac. of Medicine Hradec Králové, Charles Univ.

Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.  
Dept. of Clinical Microbiology, Thomayer Univ. Hospital,  
Prague

MUDr. Pavel Dlouhý  
Department of Infectious Diseases and AIDS Centre,  
Masaryk Hospital in Ústí nad Labem

Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.  
Department of Microbiology, Faculty of Medicine  
and Dentistry, Palacký University in Olomouc

Prof. MUDr. Petr Husa, CSc.  
Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine,  
Masaryk University and University Hospital in Brno

RNDr. Dittmar Chmelař, Ph.D.  
Dpt. of Biomedical Sciences, University  
of Ostrava's Faculty of Medicine

Doc. RNDr. Jarmila Jelínková, CSc.  
Institute for Postgraduate Medical Education, Prague

Prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.  
Inst. of Immunol. and Microbiol., 1<sup>st</sup> Fac. of Med., Charles  
Univ. in Prague and General Univ. Hosp. in Prague

Prof. MUDr. Daniela Kotulová, PhD.  
Honorary member of Slovak Society of Clinical Microbiology

MUDr. Pavla Křížová, CSc.  
National Institute of Public Health, Prague

MUDr. Roman Kula, CSc.  
Dept. of Anaesthesiology and Resuscit., Univ. Hosp. Ostrava  
Ing. Mgr. Tomáš Látal  
Trios, spol. s r. o., Prague

Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, Ph.D.  
National Institute of Public Health, Prague

MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.  
Inst. Med. Microbiol. Charles Univ. 2<sup>nd</sup> Med. Fac. Prague

MUDr. Hanuš Rozsypal, CSc.  
Dept. of Infect. Dis., 1<sup>st</sup> Med. Faculty, Charles Univ. Prague

Doc. MUDr. Luděk Rožnovský, CSc.  
Dept. Infectious Diseases, University Hospital Ostrava

MUDr. Josef Scharfen, CSc.  
Dept. Med. Microbiol. Immunol. Regional Hospital Trutnov

Prof. MUDr. Ivan Schréter, CSc.  
Clinic of Infectious Diseases, Medical faculty, Košice

Doc. MUDr. Anna Součková, CSc.  
Dept. Med. Microbiol. Charles Univ. 2<sup>nd</sup> Med. Fac., Prague

Doc. MUDr. Marie Staňková, CSc.  
Dept. Infect. Dis., 1<sup>st</sup> Med. Faculty, Charles Univ., Prague

Doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.  
Dept. of Pharmacology, Univ. Hospital Olomouc and Faculty  
of Medicine and Dentistry, Palacký Univ. Olomouc

Prof. MUDr. Miroslav Votava, CSc.  
Microbiol. Dept., Masaryk Univ. and St. Anna's Hosp. Brno

MUDr. Eva Žampachová  
Central Laboratories, The Laboratory of Virology,  
Hospital České Budějovice



## PUBLISHER

### and Editorial Office:

Redakce TRIOS, spol. s r. o.,  
Zakouřilova 142, 149 00 Praha 4-Chodov

Tel.: +420 267 912 030, Fax: +420 267 915 563

redakce@trios.cz, http://knil.trios.cz

Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Mgr. Hedvika Nevečeřalová

Advertising: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

DTP: SILVA, s. r. o., Tábořská 31, Praha 4

Printed by: GRAFOTECHNA Plus, s. r. o.

Lýskova 1594/33, 155 00 Praha 13-Stodůlky

## CONTENTS

### EDITORIAL

*L. Rožnovský*

79

### ORIGINAL ARTICLE

#### Rapid identification of ESBL-positive clinical samples using real-time PCR method

*M. Sittová, M. Dendis, Š. Dosoudilová, R. Horváth,  
M. Chromá, V. Husičková, K. Hricová, M. Kolář*

80

#### The use of electron microscopy and virus isolation in the diagnosis of aseptic neuroinfections

*L. Petroušová, L. Rožnovský, H. Zelená, M. Pomiklová,  
I. Vidličková, J. Mrázek*

85

#### Experience with laboratory diagnosis *Clostridium difficile*

*L. Bareková, E. Zálabská, I. Hanovcová*

91

### REVIEWS

#### Dwarf colonies – Small colony variants *Staphylococcus aureus*

*J. Tkadlec, O. Melter*

96

#### Cytomegalovirus and its relationship to chronic inflammatory bowel diseases and tumors

*M. Fajfr, V. Štěpánová*

103

### CASE REPORT

#### Primary meningococcal conjunctivitis with the development of a systemic disease

*L. Petroušová, L. Rožnovský*

107

This journal is Indexed in Medline/Index Medicus, Embase/Excerpta Medica Database and Scopus.

A peer – reviewed journal

4 issues per volume.

ISSN 1211-264X

Copyright © Trios Ltd. All rights reserved.

The views expressed in this journal are not necessarily those of the Editor or Editorial Board.

## Úvodník

### Vážené kolegyně a kolegové,

letošní třetí číslo mezioborového časopisu, který je určen zejména mikrobiologům a infektologům, zahrnuje pestré spektrum článků dokládajících úzkou spolupráci obou odborností. Ale nejen tvrdou a usilovnou prací živ je člověk...

V původní práci jsou uvedeny výsledky rozšířené diagnostiky aseptických neuroinfekcí s využitím elektronové mikroskopie. Poměrně překvapivě byly zjištěny možné duální neuroinfekce nebo fragmenty spirochét v likvoru, přitom nejen teoretické objasnění duálních neuroinfekcí, ale i klinická interpretace výsledků je dosud nejistá.

Infekcím přenášeným klíšťaty se na střední Moravě dlouhodobě věnuje MUDr. Marie Janečková, která poznatky z dětské populace shrnula následovně:

*Řeklo klíště klíštěti:  
Dneska půjdem na děti,  
mají hezké prdýlky  
a voňavé postýlky.  
Já se vždycky vzruším přitom,  
bude z toho lymfocytom.*

Uvedená lékařka dokonce popsala raritní kardiální manifestaci onemocnění:

*Padla jsem jak podřátá,  
napadla mě klíšťata.  
Na EKG rovná čára,  
hrobník už se v zemi štárá.*

Aktuálním námětem druhé původní práce je zrychlení a zpřesnění diagnostiky klostridiových průjmů v běžné klinické praxi.

Význam uvedených bakterií komentuje primář infekčního oddělení v Havířově MUDr. Ivo Mífek:

*Klostridia lebedí si,  
ve střevech je pohoda,  
tam si mohou prostudovat  
jídelníček národa.*

Zajímavé informace o tvorbě tzv. trpasličích kmenů „zlátých“ stafylokoků přináší první přehledné sdělení, přitom změny fenotypu stafylokoků ztěžují nejen diagnostiku, ale modifikují rovněž klinický průběh a léčbu infekce.

O problémech se stafylokoky vypovídá i zkušenost primáře Mífka:

*„Zláťáci“ jsou nadělení,  
zvláště kmemy MRSA,  
když je chlív na oddělení,  
to se jim to trsá.*

O možné spoluúčasti cytomegaloviru v etiologii nespecifických zánětů střev a nádorových onemocnění informuje druhé přehledné sdělení. Neobvyklému rozvoji invazivního meningokokového onemocnění je věnována následná kazuistika.

Snad Vám veršičky, za které kolegům moc děkuji, zpříjemní čtení našeho společného časopisu.

Luděk Rožnovský  
člen redakční rady

# Rychlá identifikace ESBL-positivních klinických vzorků metodou real-time PCR

M. SITTOVÁ<sup>1,2,3</sup>, M. DENDIS<sup>1</sup>, Š. DOSOUDILOVÁ<sup>1</sup>, R. HORVÁTH<sup>1</sup>,  
M. CHROMÁ<sup>2</sup>, V. HUSIČKOVÁ<sup>2</sup>, K. HRICOVÁ<sup>2</sup>, M. KOLÁŘ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>GeneProof a. s., Brno, <sup>2</sup>Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci,

<sup>3</sup>Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity v Brně

## SOUHRN

Sittová M., Dendis M., Dosoudilová Š., Horváth R., Chromá M., Husičková V., Hricová K., Kolář M.: **Rychlá identifikace ESBL-positivních klinických vzorků metodou real-time PCR**

**Cíl práce:** Vyvinout metodu detekce genů podmiňujících ESBL (extended spectrum beta lactamase) fenotyp bakterií přímo z klinického materiálu pacienta. Metoda umožňuje detekci genu *bla<sub>CTX-M</sub>* kódujícího CTX-M beta-laktamázy a detekci variant *bla<sub>SHV</sub>* genu technologií real-time PCR s využitím locked nucleic acid (LNA) oligonukleotidů.

**Materiál a metody:** V pilotní studii byly testovány tracheální aspiráty získané od pacientů s umělou plicní ventilací hospitalizovaných na oddělení KAR FN Olomouc v období 1. 3. až 30. 8. 2010. Každý vzorek byl standardně mikrobiologicky vyšetřen, u enterobakterií bylo provedeno fenotypové stanovení přítomnosti ESBL. Každý klinický materiál byl současně podroben analýze na přítomnost nukleových kyselin (DNA) kódujících CTX-M a SHV ESBL beta-laktamázy metodou real-time PCR.

**Výsledky:** Do testování bylo zařazeno 150 vzorků tracheálního aspirátu od 71 pacientů. V souboru bylo kultivačně identifikováno 13 (8,7 %) ESBL pozitivních vzorků, zatímco metodou real-time PCR jich bylo identifikováno 27 (18 %). Z 27 PCR pozitivních vzorků bylo pozitivních na přítomnost *bla<sub>CTX-M</sub>* sekvence 24 vzorků, dva na přítomnost ESBL *bla<sub>SHV</sub>* genu a v jednom vzorku byly identifikovány oba geny. Všechny kultivačně pozitivní vzorky byly zároveň PCR pozitivní na přítomnost *bla<sub>CTX-M</sub>* a/nebo *bla<sub>SHV</sub>* sekvence.

**Závěr:** Nová metoda výrazně zkracuje dobu detekce kmenů enterobakterií s geny pro produkci SHV a CTX-M beta-laktamáz ze 48 na 6 hodin. Umožňuje klinické využití stanovení přítomnosti ESBL-positivní enterobakterie v tracheálním aspirátu u pacientů se život ohrožující nozokomiální pneumonií, kde včasné zavedení adekvátní antimikrobiální terapie hraje významnou roli.

*Klíčová slova: ESBL, geny, detekce, tracheální aspirát*

## SUMMARY

Sittová M., Dendis M., Dosoudilová Š., Horváth R., Chromá M., Husičková V., Hricová K., Kolář M.: **Rapid identification of ESBL-positive clinical samples using real-time PCR method**

**Objectives:** A new method has been developed for detecting genes determining the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) phenotype directly from patients' clinical material. The method enables detection of the *bla<sub>CTX-M</sub>* gene encoding CTX-M beta-lactamases and the *bla<sub>SHV</sub>* gene variants with real-time PCR technology using locked nucleic acid oligonucleotides.

**Material and methods:** In this pilot study, tracheal aspirates obtained from patients with mechanical ventilation hospitalized at Department of Anaesthesiology and Resuscitation of the University Hospital in Olomouc between 1<sup>st</sup> March and 30<sup>th</sup> December 2010 period were tested. Each sample was identified with standard microbiological procedures including phenotypic determination of ESBL-positive enterobacteria. At the same time, each sample was analyzed for the presence of nucleic acids (DNA) which encode CTX-M and SHV ESBL using real-time PCR.

**Results:** 150 samples of tracheal aspirates from 71 patients were included into testing. In the set, 13 (8.7 %) ESBL-positive samples were identified by culture methods while 27 (18 %) positive samples were identified by the real-time PCR method. Of the 27 PCR-positive samples, 24 were positive for the *bla<sub>CTX</sub>* gene; in 2 samples, the ESBL *bla<sub>SHV</sub>* gene was detected, and both genes were present in 1 sample. All culture-positive samples were also PCR-positive for the presence of *bla<sub>CTX</sub>* and/or *bla<sub>SHV</sub>* sequences.

**Conclusions:** The new real-time PCR assay is likely to shorten the time for detection of enterobacteria producing SHV and CTX-M beta-lactamases from 48 to 6 hours. It enables ESBL-positive enterobacteria determination in tracheal aspirates of patients suffered from life-threatening nosocomial pneumonia where the early introduction of adequate antimicrobial treatment plays the important role.

*Keywords: ESBL, genes, detection, tracheal aspirate*

*Klin mikrobiol inf lék 2013;19(3):80–84*

**Adresa:** Mgr. Martina Sittová, GeneProof a. s., Viniční 235, 615 00 Brno, e-mail: sittova.martina@gmail.com

Došlo do redakce: 25. 1. 2013

Přijato k tisku: 7. 10. 2013

## Úvod

Jedním z nejzávažnějších problémů současné medicíny jsou bakteriální infekce, jejichž význam neustále narůstá. K možným vysvětlením patří endogenní charakter velké části infekcí a vlastní terapeutické či diagnostické přístupy, které zasahují do systému bakteriální mikroflóry lidského těla. Nedílnou součástí komplexní terapie je aplikace antimikrobních léčiv, které však z důvodu zvyšování odolnosti bakterií k jejich účinku mohou selhat. Příčinný vztah mezi vzestupem bakteriální rezistence a vyšší morbiditou i mortalitou byl v odborné literatuře opakovaně prokázán [1–3]. Současně se stále více zdůrazňována nutnost adekvátní antibiotické léčby, především v případech závažných bakteriálních onemocnění, a to včetně co nejrychlejšího nasazení účinných antimikrobních přípravků. Je zřejmé, že například v případě těžkých sepsí je optimální zahájit účinnou antibiotickou léčbu do jedné hodiny [4]. Právě tento požadavek staví před klinickou mikrobiologií problém co nejrychlejší a nejpresnější detekce bakteriálního původce, včetně stanovení jeho citlivosti/rezistence k antibiotikům.

K nejčastějším původcům bakteriálních infekcí patří enterobakterie, jejichž rezistence k penicilinům, cefalosporinům, monobaktamům a karbapenemům je podmíněna produkcí enzymů, které jsou obecně označovány jako beta-laktamázy, případně v kombinaci s nepropustností stěny (ztrátou porinů) a efluxem [5]. Velkou pozornost vyžadují zejména širokospektré beta-laktamázy typu ESBL, jejichž počet se neustále zvyšuje [6]. Enzymy typu ESBL zahrnují beta-laktamázy, které jsou schopny hydrolyzovat oxyminocefalosporiny a monobaktamy. Nejsou aktivní vůči cefamycinům a karbapenemům, jejich účinek je blokován inhibitory, jako je kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam [7]. Tyto plasmidově-kódované enzymy obsahují v aktivním místě serin, podle Amblera patří do molekulární třídy A (částečně třídy D), podle klasifikace Bushové a Jacobyho do skupiny 2be, event. 2d a 2de [8,9].

Většina ESBL jsou deriváty původních TEM a SHV enzymů s jednou nebo více substitucemi aminokyselin, které vznikly v důsledku bodových mutací v genech kódujících beta-laktamázy s úzkým spektrem účinku (SHV-1, TEM-1, resp. TEM-2) [10]. Z molekulární charakteristiky ESBL vyplývá, že většina SHV variant podmiňující ESBL fenotyp je charakterizována substitucí alaninu za kyselinu asparagovou v pozici 179, substitucí glycinu za serin v pozici 238 a substitucí kyseliny glutamové za lyzin v pozici 240 v genu *bla<sub>SHV-1</sub>* [11]. Dnes je zaznamenáno více než 213 TEM a 180 SHV variant (<http://www.lahey.org/studies>), především u kmenů *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. a *Escherichia coli* [6,12]. K novější skupině ESBL patří CTX-M enzymy, které přednostně hydrolyzují cefotaxim [7]. CTX-M enzymy obsahují více jak 40 typů, které je možné klasifikovat na základě pořadí aminokyselin do pěti skupin: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 a CTX-M-25 [13]. Kmeny *Escherichia coli* jsou nejčastějšími producenty těchto beta-laktamáz, a to v nemocničním prostředí i v komunitní oblasti [14]. Další skupinou ESBL jsou beta-laktamázy typu OXA. Tyto enzymy jsou řazeny do molekulární třídy D podle Amblera, skupiny 2d a 2de podle Bushové a Jacobyho [8,9]. Jejich výskyt v porovnání s enzymy CTX-M, TEM a SHV je u enterobakterií méně častý

a produkce je dokumentována hlavně u izolátů *Pseudomonas aeruginosa* [12].

Z hlediska epidemiologie bakterií s produkcí ESBL došlo ke značné změně. V devadesátých letech minulého století převládal výskyt kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí SHV a TEM variant [15]. V posledních letech se však situace dramaticky změnila a hlavními producenty ESBL se staly kmeny *Escherichia coli* s produkcí CTX-M-typu beta-laktamáz. Tento vývoj spíše souvisí s výskytem mobilních genetických elementů (*ISEcp1*, *IS26*, *ISCR1* a dalších) než s klonálním šířením.

Kromě standardních mikrobiologických postupů se v detekci ESBL stále více objevují molekulárně-biologické metody, které zkracují časové nároky na vyšetření a značně zvyšují senzitivitu detekce. Nejvíce zastoupenou metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR), pyrosekvenování a microarrays [15–17]. Na trhu je však dostupných i několik komerčních souprav pro detekci ESBL přímo z klinického materiálu (vzorky stěrů/výtěrů) nebo ze vzorků pozitivních hemokultur.

Cílem předložené práce bylo zhodnocení možnosti identifikace genů kódujících ESBL přímo v klinickém materiálu.

## Materiál a metody

### Soubor klinických vzorků a kultivace

Od pacientů hospitalizovaných na Klinice anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny Fakultní nemocnice Olomouc byly v průběhu 6 měsíců (od 1. 3. do 30. 8. 2010) odebrány vzorky tracheálního aspirátu. Zařazeni byli pouze pacienti s umělou plicní ventilací. Aspiráty byly odebrány standardním způsobem, duplexně (jeden vzorek pro mikrobiologické vyšetření a jeden pro PCR), 1x týdně, a to po celou dobu hospitalizace. Kultivace klinických vzorků probíhala standardními mikrobiologickými postupy, pro identifikaci bakterií byly použity automatizované systémy Phoenix (Becton Dickinson) a MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics).

### Fenotypové stanovení produkce ESBL

Produkce ESBL byla detekována stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) cefotaximu, ceftazidimu a cefoperazonu diluční mikrometodou [17]. U všech kmenů s hodnotou MIC alespoň jednoho z testovaných cefalosporinů III. generace vyšší jak  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  byl použit modifikovaný Double Disk Synergy Test k fenotypovému průkazu [18,19]. Pro kontrolu kvality byly použity referenční kmeny *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### Detekce genů kódujících ESBL ve vzorcích aspirátů

Vzorky aspirátů byly izolovány kolonkovou izolační soupravou GeneProof PathogenFree DNA Isolation kit (GeneProof a. s.).

### Detekce SHV

Sekvence primerů a sond pro detekci genu *bla<sub>SHV-1</sub>* uvádí tabulka 1. Dvojice primerů amplifikuje oblast *bla<sub>SHV-1</sub>* a jed-



notlivé sondy detekují jednobodové mutace v pozici 179, 238 a 240, které jsou charakteristické pro ESBL fenotyp.

Každá 20 µl reakce obsahuje 2 µl DNA, 10 µl Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas), 0,1 µl 100 pmol µl<sup>-1</sup> forward primeru a 0,1 µl 100 pmol µl<sup>-1</sup> reversed primeru (Sigma-Aldrich), 0,2 µl 10 pmol µl<sup>-1</sup> sondy SHV-238c (IDT), 0,2 µl 10 pmol µl<sup>-1</sup> sondy SHV-238t (IDT), 0,2 µl 10 pmol µl<sup>-1</sup> sondy SHV-179 (IDT) a 7,2 µl RNase-free vody. Amplifikační profil je: 10 minut iniciální denaturace při 95 °C, následuje 40 cyklů, z nichž každý se skládá z 10 s denaturace při 95 °C, annealingu 20 s při 64 °C a extenze 20 s při 72 °C, kdy dochází ke čtení fluorescenčního signálu. Pro real-time PCR byl použit přístroj SLAN real-time PCR system (Shanghai Odin Science & Technology Co.).

### Detekce CTX-M

Sekvence primerů a sond pro detekci genu *bla*<sub>CTX-M</sub> podle [20] uvádí tabulka 2. Pomocí navržených oligonukleotidů dochází k amplifikaci a detekci přítomnosti genu *bla*<sub>CTX-M</sub> a všech jeho variant.

Každá 20 µl reakce obsahuje 2 µl DNA, 10 µl Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas), 0,1 µl 100 pmol µl<sup>-1</sup> forward primeru a 0,1 µl 100 pmol µl<sup>-1</sup> reversed primeru (Sigma-Aldrich), 0,2 µl 10 pmol µl<sup>-1</sup> sondy FAM (IDT), 0,2 µl 10 pmol µl<sup>-1</sup> sondy HEX (IDT) a 7,4 µl RNase-free vody. Amplifikační profil je: 10 minut iniciální denatu-

race při 95 °C, následuje 45 cyklů, z nichž každý se skládá z 10 s denaturace při 95 °C, annealingu 20 s při 60 °C a extenze 20 s při 72 °C, kdy dochází ke čtení fluorescenčního signálu. Pro real-time PCR byl použit přístroj SLAN real-time PCR system (Shanghai Odin Science & Technology Co.)

### Výsledky

Během stanoveného období bylo do testování zařazeno 150 vzorků tracheálního aspirátu od 71 pacientů. Z těchto klinických materiálů bylo získáno celkem 46 izolátů enterobakterií (nejčastěji *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*), a to z 39 (26,0 %) aspirátů od 26 (36,6 %) pacientů. Tabulka 3 uvádí přehled izolovaných kmenů včetně výsledků fenotypového stanovení produkce ESBL. U 13 (8,7 %) vzorků aspirátu byla kultivačně prokázána přítomnost enterobakterie produkující ESBL.

Metodou real-time PCR bylo identifikováno 27 (18 %) pozitivních vzorků, resp. aspirátů s přítomností genů pro produkci CTX-M nebo SHV. Z 27 PCR pozitivních vzorků bylo pozitivních na přítomnost *bla*<sub>CTX-M</sub> sekvence 24 vzorků, dva na přítomnost ESBL *bla*<sub>SHV</sub> genu a v jednom vzorku byly identifikovány oba geny. Všechny kultivačně ESBL-pozitivní vzorky (n = 13) byly zároveň PCR pozitivní na přítomnost *bla*<sub>CTX-M</sub> a/nebo *bla*<sub>SHV</sub> sekvence. Naopak z PCR pozitivních materiálů (n = 27) bylo 14 (51,9 %) kultivačně negativních (tabulka 4).

Metodou real-time PCR byla také stanovena přítomnost *bla*<sub>SHV-1</sub> genu. Celkem byl tento gen detekován u 45 vzorků aspirátů. Z toho byl gen detekován u 19 (42,2 %) vzorků, které byly kultivačně pozitivní na kmen *Klebsiella pneumoniae*. 17 (37,8 %) vzorků bylo pozitivních metodou real-time PCR a zároveň v kultivaci nebyla přítomna *Klebsiella pneumoniae*. 8 (17,8 %) vzorků bylo pozitivních na přítomnost *bla*<sub>SHV-1</sub> genu a zároveň kultivačně sterilních. U jednoho (2,2 %) vzorku, kde byla kultivačně stanovena *Klebsiella pneumoniae*, nebyl metodou real-time PCR *bla*<sub>SHV-1</sub> gen detekován.

Z dosažených výsledků (tabulka 4) byla stanovena pozitivní (PPV) a negativní (NPV) prediktivní hodnota v porovnání se „zlatým standardem“ (kultivační metody). PPV nové metody real-time PCR je 48 %, NPV je 100 %. Senzitivita metody byla stanovena na 100 % a specifita na 90 %. Celková přesnost metody je 91 %.

### Diskuze a závěr

Z uvedených výsledků je zřejmé, že real-time PCR metoda má vyšší senzitivitu při detekci přítomnosti

Tabulka 1

Sekvence primerů a sond pro detekci genu *bla*<sub>SHV-1</sub>

Popis primeru/sondy	Nukleotidová sekvence*
SHV-1 forward	5' GAA AGA TCC ACT ATC GCC AGC AGG 3'
SHV-1 reversed	5' GTT GCC AGT GCT CGA TCA GCG C 3'
SHV-238c	5' FAM-CT[+C] GC[+C] AG[+C] T[+C]C-BHQ1
SHV-238t	5' FAM-TT[+C] GC[+C] AG[+C] T[+C]C-BHQ1
SHV-179	5' HEX-TG[+T] CG[+C] G[+G]G CG-BHQ1

\*[+] = LNA modifikace

Tabulka 2

Sekvence primerů a sond pro detekci genu *bla*<sub>CTX-M</sub>

Popis primeru/sondy	Nukleotidová sekvence*
CTX-M forward	5' ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC 3'
CTX-M reversed	5' ATC ACK CGG RTC GCC IGG RAT 5'
CTX-M-1	5' HEX-CCC GAC AGC TGG GAG ACG AAA CGT-BHQ1 3'
CTX-M-y	5' FAM-C[+G]A[+C]AA[+T]A[+C]YG[+C]C-BHQ1 3'

\*K = G nebo T; R = A nebo G; Y = C nebo T; I = A, C, G nebo T;

[+] = LNA modifikace

Tabulka 3  
Přehled kmenů izolovaných z aspirátů včetně výsledků fenotypového stanovení produkce ESBL

Bakteriální druh	Počet izolátů	
	ESBL+	ESBL-
<i>Escherichia coli</i>	1	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	11
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	5
<i>Enterobacter</i> sp.	6	1
<i>Proteus vulgaris</i>	0	1
<i>Proteus mirabilis</i>	0	1
<i>Providencia rettgeri</i>	0	1
<i>Citrobacter koseri</i>	0	2
<i>Citrobacter braakii</i>	0	1
Celkem	13	33

ESBL-pozitivních mikrobiálních kmenů v klinickém materiálu pacientů. Tomu nasvědčuje i 14 PCR pozitivních výsledků, které nebyly kultivačně pozitivní nebo u izolovaných kmenů nebyla prokázána produkce ESBL fenotypovými metodami (klinická senzitivita metody dosahuje 100 %). I při vyšší citlivosti si test zachovává 90% specificitu a 100% negativní prediktivní hodnotu. Pozitivní prediktivní hodnota, stanovená proti zlatému standardu (kultivační metody), sice dosahuje hodnoty pouze 48 %, ale je třeba zdůraznit, že přítomnost detekovaných genů v klinickém materiálu nemusí vždy vést k fenotypovému projevu. PCR pozitivita kódujících genů může ale být varováním před užitím antibiotik, které tyto kmeny mohou selektovat. V klinické praxi by bylo možné v souladu s klinickým stavem pacienta již na tento nálezn reagovat změnou antibiotické terapie.

Rovněž byla stanovena přítomnost *bla<sub>SHV-1</sub>* genu, kódujícího produkci enzymu s úzkým spektrem účinku u 8 kultivačně zcela negativních vzorků aspirátů. Tento typ enzymu

(SHV-1) byl detekován téměř u všech klinických vzorků, kde byl kultivačně potvrzen záchyt kmenů *Klebsiella pneumoniae* (výskyt *bla<sub>SHV-1</sub>* genu je u tohoto druhu vázán na chromozom) [21]. Pouze u jednoho vzorku, který byl kultivačně pozitivní na kmen *Klebsiella pneumoniae*, nebyl metodou real-time PCR zachycen pravděpodobně z důvodu inhibice. Vyšší senzitivita molekulárně-biologické metody ve srovnání s kultivací je pravděpodobně dána probíhající antibiotickou léčbou u řady pacientů, která růst kmenů inhibuje.

Výhodou vyvinuté metody real-time PCR detekce genů kódujících CTX-M a SHV beta-laktamázy přímo v klinickém materiálu (tracheálním aspirátu) je rychlost. Výsledek detekce může být k dispozici do 6 hodin od odběru vzorku. Rychlý průkaz přítomnosti ESBL-pozitivní enterobakterie v tracheálním aspirátu je přínosný zejména u pacientů se život ohrožující nozokomiální pneumonií, která může být spojena se sepsí. V tomto případě je vhodnější použít v terapii antimikrobní léčiva s účinkem na uvedené bakterie, například karbapenemy. Naopak v případě negativního průkazu lze použít jiná antimikrobní léčiva, a tím snížit rostoucí spotřebu karbapenemů, která je spojena se zvyšující se četností meropenem-rezistentních bakterií, např. kmenů *Pseudomonas aeruginosa* [22]. Navrhovaný postup by mohl vést k další racionalizaci antibiotické léčby, která je nezbytná pro zachování účinnosti antimikrobních léčiv.

PCR pozitivita aspirátu na geny kódujících ESBL by mohla být klinicky významná také u pacientů s neznámým nebo podezřelým epidemiologickým statutem (pacienti přeložení z jednotek intenzivní péče jiného zdravotnického zařízení, léčeben pro dlouhodobě nemocné, zahraničí atd.) Pro účely konečného rozhodnutí o antimikrobiální terapii a zařazení pacienta do epidemiologického režimu by v těchto případech bylo nutné případnou rezistenci ověřit kultivačním vyšetřením a stanovením fenotypu.

Nová technologie nevyžaduje úspěšnou kultivaci a umožňuje nalézt rezistentní kmeny i v případech, kdy kultivační vyšetření bylo negativní. Tak tomu bylo u 14 ESBL kultivačně negativních a zároveň PCR pozitivních vzorků v této studii. V pokračování naší studie budou tyto případy detailně sledovány a posouzeny s cílem zajištění dostatku dat a klinické relevance těchto výsledků.

Aplikace průkazu genů podmiňující ESBL fenotyp metodou PCR přímo z klinického materiálu nebyla ještě v odborné literatuře publikována, jedná se tedy o prvotní popis metodiky, která může přispět k racionální antibiotické léčbě u závažných a život ohrožujících bakteriálních infekcí s etiologickou rolí ESBL-pozitivních bakterií.

Tabulka 4  
Srovnání výsledků ESBL pozitivních záchytů kultivační metodou a metodou real-time PCR

Výsledek PCR		Výsledek kultivace		
		pozitivní	negativní	celkem
Výsledek PCR	pozitivní	13	14	27
	negativní	0	123	123
Celkem		13	137	150

Podpořeno projektem Ministerstva průmyslu a obchodu „Vývoj diagnostických souprav pro rychlou detekci vybraných typů bakteriální rezistence“ a grantem IGA MZ ČR 9950-3.

Vyvinuté technologie jsou chráněny užitným vzorem, přihláška č. 2012-27246.

## Literatura

- Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, et al. Clinical and economic impact of bacteremia with extended- spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1257–1262.
- Kang CI, Kim SH, Park WB, et al. Clinical outcome of bacteremic spontaneous bacterial peritonitis due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Korean J Intern Med.* 2004;19(3):160–164.
- Hanulík V, Husičková V, Htoutou Sedláková M, Kolář M. Bakteriální původci pneumonií u pacientů v intenzivní péči. *Klin Mikrobiol Inf Lék.* 2011;17:134–139.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34(6):1589–1596.
- Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(2):165–74.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657–686.
- Giamarellou H. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect.* 2005;11 Suppl 4:1–16.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321–331.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969–976.
- Tasli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceae in Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 2005;58(3):162–167.
- Huletsky A, Knox JR, Levesque RC. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J Biol Chem.* 1993;268(5):3690–3697.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):933–951, table of contents.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1–14.
- Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 1990;18(5):294–298.
- Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis.* 2001;32 Suppl 2:S94–103.
- Lascols C, Hackel M, Hujer AM, et al. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel beta-lactamases: a snapshot of extended-spectrum beta-lactamases throughout the world. *J Clin Microbiol.* 2012;50(5):1632–1639.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement. 2007:M100–S17.
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):867–878.
- Kolář M. Klinický význam širokospektrých beta-laktamáz a zkušenosti s jejich identifikací v mikrobiologické praxi. *Klin Mikrobiol Inf Lék.* 2007;13:195–205.
- Birkett CI, Ludlam HA, Woodford N, et al. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 1):52–55.
- Chaves J, Ladona MG, Segura C, et al. SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(10):2856–2861.
- Lipovy B, Rihova H, Hanslianova M, et al. Prevalence and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in severely burned patients: a 10-year retrospective study. *Acta Chir Plast.* 2010;52(2–4):39–43.



# Využití elektronové mikroskopie a izolace viru v diagnostice aseptických neuroinfekcí

L. PETROUŠOVÁ<sup>1</sup>, L. ROŽNOVSKÝ<sup>1</sup>, H. ZELENÁ<sup>2</sup>, M. POMIKLOVÁ<sup>2</sup>,  
I. VIDLIČKOVÁ<sup>2</sup>, J. MRÁZEK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Klinika infekčního lékařství, Fakultní nemocnice Ostrava, <sup>2</sup>Oddělení virologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě,

<sup>3</sup>Oddělení molekulární biologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

## SOUHRN

Petroušová L., Rožnovský L., Zelená H., Pomiklová M., Vidličková I., Mrázek J.: **Využití elektronové mikroskopie a izolace viru v diagnostice aseptických neuroinfekcí**

**Cíl práce:** Etiologická objasněnost aseptických neuroinfekcí kolísá většinou v intervalu 50–70 %. Cílem práce bylo zvýšit objasněnost aseptických neuroinfekcí pomocí elektronové mikroskopie (EM) a izolace viru na tkáňových kulturách.

**Materiál a metody:** Prospektivní studie zahrnovala 34 pacientů s aseptickou neuroinfekcí, kteří byli hospitalizováni na Klinice infekčního lékařství v Ostravě od července do listopadu 2012. U všech pacientů byl likvor vyšetřen EM a byl proveden izolační pokus na tkáňových kulturách. Polymerázovou řetězovou reakcí byl likvor vyšetřen u 30 pacientů na enteroviry, u 29 pacientů na virus herpes simplex 1 a 2. Vyšetření protilátek proti *Borrelia burgdorferi* a klíšťové encefalitidě bylo provedeno u všech 34 pacientů.

**Výsledky:** Možné etiologické agens bylo zjištěno u 31 z 34 pacientů (91 %), u 23 pacientů (68 %) byl zjištěn jeden původce, ale u 8 pacientů (24 %) současně dvě agens. Pomocí EM byl zjištěn původce u 26 pacientů, izolace viru byla úspěšná u 10 pacientů. EM jako jediná určila 10 původců. Skupina 23 pacientů s průkazem jednoho agens zahrnovala 14 pacientů s enterovirovou meningitidou, 4 pacienty s lymeskou borreliózou, 4 pacienty s klíšťovou encefalitidou, u posledního pacienta byl EM zjištěn blíže nespecifikovaný virus. Neobvyklá skupina 8 pacientů, ve které byli zjištěni dva původci, zahrnovala 5 pacientů se současným průkazem enterovirů a spirochét, 2 pacienty s klíšťovou encefalitidou a blíže neurčeným virem, u posledního pacienta byla prokázána spirochéta rovněž s neurčeným virem.

**Závěr:** EM může zvýšit objasněnost aseptických neuroinfekcí. Přesto dosud není vyřešena klinická interpretace výsledků, zejména záchyty dosud neurčených virů a dvou možných původců u 8 z 34 pacientů.

*Klíčová slova:* aseptické neuroinfekce, elektronová mikroskopie, izolace viru, spirochety, *Borrelia burgdorferi*

## SUMMARY

Petroušová L., Rožnovský L., Zelená H., Pomiklová M., Vidličková I., Mrázek J.: **The use of electron microscopy and virus isolation in the diagnosis of aseptic neuroinfections**

**Objective:** In aseptic neuroinfections, the etiology is usually known in 50–70 % of cases. The aim was to increase the rates using electron microscopy (EM) and virus isolation in cell cultures.

**Material and methods:** The prospective study included 34 patients with aseptic neuroinfections hospitalized at the Department of Infectious Diseases in Ostrava from July to November 2012. EM examined cerebrospinal fluid of all patients and virus isolation in tissue cultures was performed in all cerebrospinal fluid samples. Cerebrospinal fluid was examined by polymerase chain reaction for enteroviruses in 30 patients and for herpes simplex virus 1 and 2 in 29 patients. Detection of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and tick-borne encephalitis was performed in all 34 patients.

**Results:** Possible etiological agents were discovered in 31 out of 34 patients (91 %), with one agent being found in 23 patients (68 %) and two agents being detected in 8 patients (24 %). EM revealed the agents in 26 patients and virus isolation was successful in 10 patients. EM was the only method to identify 10 agents. A group of 23 patients with a single agent detected included 14 patients with enteroviral meningitis, 4 patients with Lyme borreliosis and 4 patients with tick-borne encephalitis; EM detected an undefined virus in the last patient. An unusual group of 8 patients with two agents detected comprised 5 patients with enteroviruses and spirochetes, 2 patients with tick-borne encephalitis and undefined viruses and 1 patient with a spirochete and an undetermined virus.

**Conclusion:** EM can aid in explaining the etiology of aseptic neuroinfections. However, the clinical interpretation of results remains problematic, such as detection of unknown viruses or two possible agents in 8 out of 34 patients.

*Keywords:* aseptic neuroinfection, electron microscopy, virus isolation, spirochete, *Borrelia burgdorferi*

*Klin mikrobiol inf lék 2013;19(3):85–90*

**Adresa:** MUDr. Lenka Petroušová, Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 00 Ostrava, e-mail: lenka.petrousova@gmail.com

Došlo do redakce: 17. 7. 2013

Přijato k tisku: 11. 9. 2013

## Úvod

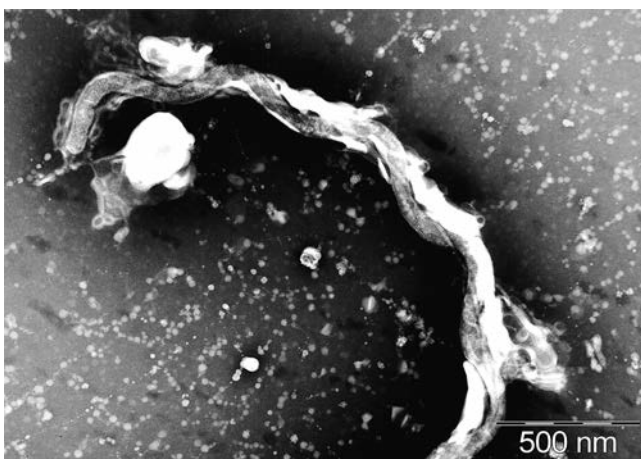
Aseptické neuroinfekce mají velký rozptyl klinických příznaků od nezávažných meningitid až po těžké encefalitidy s možným úmrtím nebo s neurologickými následky. Pouze na základě klinických příznaků je obtížné usuzovat na etiologii onemocnění. Nejčastějšími původci aseptických neuroinfekcí v naší republice jsou enteroviry, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, virus klíšťové encefalitidy a respirační viry [1]. Méně často se uplatňují virus herpes simplex (HSV) typu 1 a 2 nebo virus varicely a zosteru (VZV). U imunokompromitovaných pacientů připadá v úvahu i cytomegalovirus (CMV), vzácně i virus Epsteinova a Barrova (EBV). Zásluhou vakcinace není v České republice diagnostikována poliomyelitida, tetanus a neurologické komplikace spalniček, zarděnek a vztekliny [1]. Vzhledem k narůstajícímu počtu pacientů infikovaných virem HIV je třeba vzít v úvahu, že desetina nově infikovaných má během akutní fáze neurologické příznaky, které mají charakter aseptické meningitidy [1].

U některých pacientů je nutno v etiologii aseptických meningitid zvažovat i geografické souvislosti a rychlé změny v rozšíření některých arboviróz. Např. na jižní Moravě byl v komárech identifikován virus Ťahyňa a West Nile virus, navíc byl v roce 2012 zachycen na jižní Moravě komár *Aedes albopictus*, který může přenášet horečku dengue a chikungunya [2,3]. Objasnění etiologie nehnisavých zánehtlivých postižení centrálního nervového systému je důležité nejen z epidemiologického hlediska, ale může přispět i k adekvátní léčbě pacientů a zlepšit jejich prognózu, což platí zejména pro časnou léčbu herpetické encefalitidy.

Na Klinice infekčního lékařství v Ostravě bylo v období 2004–2011 hospitalizováno 963 pacientů s aseptickou neuroinfekcí, etiologie byla objasněna u 520 pacientů (54 %).

V roce 2012 bylo na shodném pracovišti hospitalizováno 81 pacientů s aseptickou meningitidou, z nich u 34 byla v rámci řešení grantu rozšířena diagnostika o elektronovou mikroskopii a izolační pokus na tkáňových kulturách. Cílem práce bylo zvýšit objasňenost aseptických neuroinfekcí a stanovit přínos těchto metod v jejich diagnostice.

Obr. 1  
Likvor – spirochéta



## Materiál a metody

Prospektivní studie zahrnovala 34 pacientů s aseptickou neuroinfekcí, kteří byli hospitalizováni na Klinice infekčního lékařství v Ostravě od července do listopadu 2012. Kritériem zařazení pacienta do studie byl zánehtlivý nález v likvoru, počet elementů převyšující  $5 \cdot 10^6/l$  elementů.

Při vyšetření elektronovým mikroskopem (EM) byl použit transmisní elektronový mikroskop JEM 1230. Vzorky byly hodnoceny klasickou elektronovou mikroskopii s využitím techniky negativního barvení, jako kontrastní barvivo byl použit roztok molybdenanu amonného. V první fázi byla z každého vzorku odebrána alikvotní část likvoru pro okamžitou aplikaci na EM síčku s následným obarvením kontrastním roztokem. Poté byl likvor centrifugován 30 minut/1 400 G, supernatant pak 10 minut/110 000 G. Sediment byl resuspendován v 50  $\mu$ l deionizované vody a opět negativně obarven roztokem molybdenanu amonného. Při diagnostice spirochét byly některé vzorky likvoru navíc hodnoceny i metodou imunoelektronové mikroskopie. U této metody byly vzorky před obarvením kontrastním roztokem navíc inkubovány v přítomnosti primárních protilátek proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato (anti OspA a OspC) a následně v přítomnosti sekundárních specifických protilátek značených zlatem, což umožnilo detekovat *Borrelia burgdorferi*. Vzorky v EM byly prohlíženy při zvětšeních 1 000–25 000 $\times$ , fotografie byly pořízeny při zvětšeních 60 000–300 000 $\times$ .

Při izolačním pokusu na tkáňových kulturách byl likvor inokulován v množství 0,2 ml do Leightonovy zkumavky s narostlou buněčnou kulturou. Použity byly buněčné linie CV-1 (opíčí ledvinné buňky), PS (buňky prasečích ledvin) a LEP 19 (diploidní lidské embryonální plíce). Uvedená kombinace buněčných linií byla zvolena z důvodu zachytu co nejširšího spektra virů.

PCR vyšetření HSV 1 a 2 byly vyšetřeny komerčním testem GeneProof(r) Herpes simplex virus 1/2 PCR Kit. Enteroviry byly stanovovány pomocí home-made real-time PCR. Sérologická diagnostika enterovirů v séru byla provedena metodou ELISA (ELISA Enterovirus IgG, IgM, IgA, výrobce Virion/Serion), při diagnostice Coxsackie virů byl použit virus neutralizační test v mikromodifikaci s neutrálním barvením (home-made metoda – buněčná kultura CV-1 a virové kmeny Coxsackie B1-6, původ v SZÚ Praha, NRL pro enteroviry).

Diagnostika lymeské borreliózy spočívala ve vyšetření protilátek v likvoru a séru metodami ELISA (*Borrelia* recombinant, Test-Line) a Western blot (Anti-*Borrelia* Euroline WB, Euroimmun). K přímé detekci pomocí PCR byl použit komerční test GeneProof® *Borrelia burgdorferi* PCR Kit. Neuroborrelióza byla definována průkazem protilátek v likvoru nebo pozitivním výsledkem PCR metody v likvoru. K diagnostice klíšťové encefalitidy v séru (případně v likvoru) byla použita metoda ELISA (Viditest anti-TBEV, Vidia) a mikromodifikace virus neutralizačního testu s neutrálním barvením (home-made metoda s použitím virového kmene Hypr a buněčné kultury PS).

Prospektivní grantová studie byla schválena místní etickou komisí, všichni pacienti nebo jejich zákonní zástupci před vstupem do studie podepsali informovaný souhlas.

## Výsledky

V souboru 34 pacientů bylo 25 mužů a 9 žen, věkový průměr byl 22 let (4–64 let). Likvorový nález u všech pacientů odpovídal aseptické meningitidě, průměrný počet elementů byl  $220 \cdot 10^6/l$  (6–900  $\cdot 10^6/l$  elementů). Průměrná hodnota C reaktivního proteinu v séru dosahovala 30 mg/l (19–190 mg/l), průměrná doba hospitalizace byla 11 dnů (5–28 dnů). Pouze 2 pacienti měli závažnější přidružené onemocnění, jednalo se o chronickou obstrukční chorobu bronchopulmonální a hypertenzi. Jediný pacient měl v anamnéze aseptickou meningitidu. Všichni pacienti měli likvor vyšetřen EM a byla provedena kultivace viru, u 29 pacientů byl likvor vyšetřen metodou PCR na přítomnost HSV 1 a 2, 30 pacientů mělo likvor vyšetřen PCR metodou na přítomnost enterovirů. Sérologické vyšetření protilátek proti enterovirům a virům Coxsackie bylo provedeno u 15 pacientů. Všichni pacienti měli vyšetřeny protilátky proti *Borrelia burgdorferi* v likvoru a proti klíšťové encefalitidě v séru. Etiologické agens se podařilo určit u 31 z 34 pacientů (91 %) s aseptickou meningitidou.

Přehled prokázaných infekčních agens stanovených jednotlivými metodami je uveden v *tabulce 1*, ve které je relativní počet pozitivních výsledků vztažen k počtu vyšetřených pacientů uvedenou metodou.

U 8 pacientů byla zjištěna 2 agens, což odpovídá celkem 39 původcům u 31 pacientů. U některých pacientů byl původce prokázán i několika metodami, což je uvedeno v *tabulce 2*.

EM a izolace viru prokázala 30 agens, jednalo se o 21 virů a 9 spirochét, přičemž 6 virů zachytily obě metody.

## Elektronová mikroskopie

Pomocí EM bylo zjištěno agens u 26 pacientů, přitom EM jako jediná prokázala 10 možných původců.

U 17 pacientů byly nalezeny malé kulaté viry velikosti 19–30 nm. U 13 pacientů byly sérologicky nebo PCR diagnostikou prokázány enteroviry, velikost virů u uvedených pacientů byla 22–30 nm.

U zbývajících 4 pacientů se nepodařilo viry o velikosti 19–27 nm dále určit, všichni měli negativní výsledek PCR na enteroviry a rovněž sérologické vyšetření enterovirů bylo negativní (u 3 pacientů nebylo vyšetřeno párové sérum). Další metody k přesnějšímu určení viru, např. sekvenace genomu, nebyly provedeny. U 3 z těchto 4 pacientů bylo současně zjištěno další agens. Dva pacienti měli současně sérologicky prokázanou klíšťovou encefalitu, v jejich likvoru nebyl PCR metodou detekován virus klíšťové encefalidity a navíc neznámý virus velikostí a tvarem neodpovídal viru klíšťové encefalidity. Třetí pacient měl v EM současně prokázán spirochétu.

U 9 pacientů byly prokázány v EM spirochéty, viz *obr. 1* a *tabulka 3*. Pouze 3 pacienti měli v likvoru protilátky proti *Borrelia burgdorferi*, což potvrdilo neuroborreliózu, další pacientka měla opakovaně pouze hraniční IgM protilátky v séru. U zbývajících 5 pacientů nebyly prokázány protilátky proti *B. burgdorferi* ani v séru, ani v likvoru, navíc u nich byla zjištěna možná duální etiologie neuroinfekce. U 4 z 6 pacientů byl likvor vyšetřen metodou PCR na borrelii s negativním nálezem. U 4 pacientů byla sérologicky vyloučena lues a leptospiróza, u 2 dětí ve věku 8 a 13 let nebyla uvedena vyšetření provedena.

U jediného pacienta (č. 4 v *tabulce 3*) bylo provedeno imunoelektronové vyšetření likvoru s pozitivním nálezem. Obdobné vyšetření bylo provedeno s laboratorní kulturou *Borrelia burgdorferi*, rovněž došlo k navázání protilátek na uvedenou bakterii. K vyloučení falešně pozitivních výsledků byla imunoelektronová mikroskopie provedena v likvoru 4 pacientů s průkazem virové etiologie, u žádného nedošlo k navázání protilátek.

## Izolace viru

Izolace viru byla pozitivní u 10 pacientů, vždy se jednalo o tkáňové kultury typické pro růst enterovirů. Na tkáňové kultuře CV-1 byla izolace pozitivní u 2 pacientů, na LEP 19 u jednoho pacienta, na obou kulturách u 7 pacientů. Následné PCR vyšetření z tkáňových kultur bylo provedeno u 4 pacientů, vždy byly potvrzeny enteroviry. U zbývajících

Tabulka 1  
Výsledky jednotlivých vyšetření u 34 pacientů

Metoda	Počet pacientů	Pozitivní výsledek	Zjištěný patogen
EM	34	26 (76 %)	17x malý kulatý virus 19–30 nm (13x enteroviry*, 4x virus neurčen), 9x spirochéty
Izolační pokus	34	10 (29 %)	10x enteroviry*
PCR enteroviry	30	16 (53 %)	
PCR HSV 1 a 2	29	0	
Sérologie klíšťové encefalidity	34	6 (18 %)	
Sérologie lymeské borreliózy	34	4 (11 %)	
Sérologie enterovirů	15	5 (33 %)	3x Coxsackie viry, 2x enteroviry

Poznámka: \* = přesné určení enterovirů pomocí PCR metody nebo sérologie

6 pacientů nebyla PCR diagnostika izolovaných virů provedena. U všech 10 pacientů byly prokázány enteroviry v likvoru pomocí PCR, a proto je možno považovat 6 izolovaných virů rovněž za enteroviry.

**Další diagnostika**

Metoda PCR a sérologická vyšetření prokázaly etiologii u 28 z 34 pacientů (82 %), jednalo se o 29 původců, viz *tabulka 4*. Jediný pacient (č. 5 v *tabulce 3*), který měl duální infekci diagnostikovanou běžnými metodami, měl kombinaci lymeské borreliózy a enterovirové meningitidy.

U 3 pacientů se nepodařilo identifikovat žádného původce ani standardními metodami, ani izolací viru nebo EM. V souboru 34 pacientů nebyla diagnostikována infekce vyvolaná HSV, a to ani PCR diagnostikou, ani EM.

**Průkaz dvou agens**

Kombinace běžných metod s EM a izolací viru prokázala u 8 pacientů 2 agens, u všech byla jednou z pozitivních metod EM. Všichni pacienti už byli zmíněni dříve, jednalo se o 6 pacientů s průkazem spirochét a viru (viz *tabulka 3*) a 2 pacienty s klíšťovou encefalitidou s neurčeným virem (viz komentář EM).

**Klinické hodnocení**

V souboru 34 pacientů převažovaly klinicky nezávažné aseptické meningitidy, které byly prokázány u 28 pacientů (82 %), meningoencefalitida byla zjištěna u 6 pacientů, z nichž 4 byli přechodně hospitalizováni na JIP. Tři pacienti měli parézu lícního nervu, dva měli lymeskou borreliózu, třetí měl zjištěnou infekci Coxsackie viry. Příznivý vývoj onemocnění byl u 33 pacientů. Poslední pacient s meningoencefalitidou se sérologickým průkazem Coxsackie virů měl amnézii na 3 měsíce před začátkem onemocnění, navíc půl roku po akutním onemocnění u něj trvala porucha paměti, což pro vysokoškoláka znamenalo ukončení studia.

Možné duální infekce u všech 8 pacientů proběhly nezávažně, klinicky jako

Tabulka 2  
Porovnání jednotlivých metod u 34 pacientů (průkaz 39 možných etiologických agens u 31 pacientů)

<b>Etiologie</b> <b>Pozitivní výsledky</b>	<b>Enteroviry včetně</b> <b>Coxsackie virů</b>	<b>Borrelie</b>	<b>Klíšťová</b> <b>encefalitida</b>	<b>Neurčený</b> <b>virus</b>
PCR	1	–	–	–
PCR + EM	5	–	–	–
PCR + izolační pokus	4	–	–	–
PCR + EM + izolační pokus	4	–	–	–
PCR + EM + izolační pokus + sérologie	2	–	–	–
EM	–	6	–	4
EM + sérologie	2	3	–	–
Sérologie	1	1	6	–
Celkem	19	10	6	4

Tabulka 3  
Průkaz spirochét pomocí EM u 9 pacientů s aseptickou neuroinfekcí

<b>Pacient</b>	<b>Elektronová mikroskopie</b>	<b>PCR enterovirů</b>	<b>Pozitivní sérologie</b> <b>borreliózy v likvoru</b>	<b>Klinický průběh</b>
1.	spirochéta	pozitivní	negativní	erythema migrans v anamnéze, meningitida
2.	spirochéta	pozitivní	negativní	meningitida
3.	spirochéta	pozitivní	negativní	meningitida
4.	spirochéta a enterovirus*	pozitivní	negativní	meningitida
5.	spirochéta a enterovirus*	negativní	WB IgG	meningitida
6.	spirochéta a neurčený virus	negativní	negativní	meningoencefalitida
7.	spirochéta	negativní (sérum ELISA IgM i WB IgG)	negativní	meningoencefalitida s poruchou vědomí
8.	spirochéta	negativní	ELISA IgG, WB IgG	meningitida s parézou lícního nervu
9.	spirochéta	nevyšetřeno	ELISA IgG	meningitida

Poznámka: WB = Western blot, \* = přesné určení enterovirů pomocí PCR metody nebo sérologie



aseptická meningitida, pouze u jediného pacienta s duální infekcí klinický obraz odpovídal meningoencefalitidě.

Všech 9 pacientů s nálezem spirochét v likvoru bylo léčeno antibiotiky, u 8 pacientů byl použit cefalosporin 3. generace, u 1 dítěte byl podán amoxicilin. Přitom u 6 pacientů bez sérologického potvrzení lymeské borreliózy se jednalo o léčbu z určitých rozpaků vzhledem k pozitivní přímé diagnostice v EM.

## Diskuze

V souborech pacientů s aseptickými neuroinfekcemi se pohybuje etiologická objasněnost v intervalu 50–70 %, studie z Norska uvádí určení etiologie až u 90 % pacientů, ale např. v Polsku se pohybuje jen kolem 17 % [4–7]. Na Klinice infekčního lékařství v Ostravě se v souboru 963 pacientů v období 2004–2011 postupně zlepšila objasněnost aseptických neuroinfekcí ze 40 % na 70 %, a to hlavně zásluhou rutinního využívání PCR vyšetření a sérologické diagnostiky [8].

V rámci grantové studie, která proběhla v roce 2012, se podařilo objasnit etiologii u 31 z 34 pacientů (91 %) zejména zásluhou elektronové mikroskopie. EM prokázala možného původce nejčastěji ze všech použitých metod, celkem u 26 z 34 pacientů (76 %), navíc jako jediná prokázala 10 různých původců. Izolace viru byla úspěšná u 10 pacientů (29 %), přesto ani u jednoho pacienta nebyla jedinou pozitivní metodou při průkazu původce meningitidy.

Elektronová mikroskopie v likvoru dosud není standardní diagnostickou metodou, což může ztěžovat interpretaci získaných výsledků. Přesto jsou získané výsledky získané pomocí EM pozoruhodné, u 4 pacientů byl prokázán dále neurčený virus, u 9 pacientů byly nalezeny spirochéty a u 8 pacientů byla zjištěna možná duální etiologie aseptické meningitidy.

Všechny 4 neurčené viry měly velikost 19–27 nm, jednalo se o malé kulaté viry podobné enterovirům, jejichž velikost je uváděna do 30 nm [9]. Další v úvahu připadající agens mají rozdílný tvar a velikost, např. flaviviry a togaviry (virus klíšťové encefalidity, virus dengue, West Nile virus, virus chikungunya) dosahují velikosti 40–60 nm, HSV 1 a 2 mají 150–250 nm [9].

Spirochéty byly pomocí EM v likvoru prokázány u 9 z 34 pacientů, pouze u 3 pacientů byla sérologicky jednoznačně potvrzena neuroborrelióza, ale u 6 pacientů nebyly prokázány specifické protilátky v likvoru. Elektronovou mikroskopií není možné jednoznačně rozlišit borrelie od dalších spirochét, což ztížilo diagnostiku u 6 pacientů bez sérologického potvrzení neuroborreliózy. Podle českého i evropského doporučení přímá diagnostika borrelí nepatří mezi standardní metody pro nízkou senzitivitu a specifitu, diagnostika neuroborreliózy spočívá v detekci specifických protilátek v likvoru [10,11]. V doporučených se zmiňuje zástinová mikroskopie, EM je uvedena pouze pro vý-

zkumné účely. Diagnostika borreliózy pomocí mikroskopie byla použita např. v souboru pacientů s kožními změnami, EM prokázala borrelie v biopsiích z myokardu u pacientů s kardiomyopatií a myokarditidou [12–14]. V souboru 15 slovenských pacientů s časnou diseminovanou borreliózou byla provedena kultivace borrelí v likvoru a plazmě, následně EM prokázala borrelie u 8 pacientů v krvi a u jednoho pacienta v likvoru, přičemž 7 z uvedených pacientů mělo negativní sérologické vyšetření [15]. Ve shodném souboru bylo PCR vyšetření na borrelie pozitivní u 9 pacientů, ale jen u 1 pacienta v likvoru, u 8 pacientů v krvi. V našem souboru byly vyšetřovány nativní likvory bez kultivace, záchyt spirochét EM byl u 9 pacientů, z nichž u 4 byla provedena PCR diagnostika, vždy s negativním výsledkem, což může poukázat na vyšší citlivost EM ve srovnání s PCR diagnostikou. Navíc PCR diagnostika neuroborreliózy má nízkou senzitivitu, u časných neuroborreliózy se pozitivní výsledky prokazují u 10–30 % pacientů, u pozdní neuroborreliózy ještě vzácněji [11,16].

V přímé diagnostice borrelí se zkoušela i detekce antigenů, např. v souboru amerických pacientů se podařilo stanovit antigen *Borrelie burgdorferi* u 42 % pacientů s neuroborreliózou s negativním sérologickým vyšetřením [17]. Přímá detekce borrelí v likvoru může mít význam hlavně v časných fází infekce, do 6 týdnů od začátku onemocnění, kdy protilátky ještě nemusí být vytvořeny [11].

U našich 6 pacientů s průkazem spirochét v likvoru jsme rovněž zvažovali časnou fázi neuroborreliózy, což podpořil i výsledek imunoelektronové mikroskopie u jednoho pacienta. Zejména z diagnostických rozpaků všichni pacienti obdrželi antibiotickou léčbu. Navíc jednoznačnou interpretaci výsledků komplikovala skutečnost, že spirochéty byly zjištěny u 6 z 8 pacientů s možnou duální infekcí.

EM je subjektivní metoda, která je závislá na zkušenostech hodnotitele, kvalita laboratoří je hodnocena v systému mezinárodního externího hodnocení kvality (EHK). Virologická laboratoř, která prováděla hodnocení likvorů našich pacientů, se účastní EHK od roku 2007 a dosahuje výborných výsledků, proto si myslíme, že kontaminace likvoru je nepravděpodobná a pozitivní nálezy odpovídaly spirochétám i virům. Nálezy byly také porovnány s morfologií virů a borrelí z kultur. Navíc k upřesnění nálezu spirochét byla použita i imunoelektronová mikroskopie.

Tabulka 4  
Etiologie onemocnění u 34 pacientů

Etiologie	Počet původců s pozitivní diagnostikou	
	PCR nebo sérologie	EM nebo izolační pokus
Enteroviry včetně Coxsackie virů	19	17
Klíšťová encefalitida	6	0
Virus neurčený	0	4
Borrelie (nebo spirochéty)	4	9
Celkem agens	29	30



Duální neuroinfekce se dosud považovaly za relativně vzácné. V endemických oblastech se může klíšťová encefalita kombinovat s neuroborreliózou, což bylo např. diagnostikováno u 3 z 631 pacientů hospitalizovaných na pracovišti autorů v letech 2007–2012 (dosud nepublikované údaje). Rovněž v literatuře jsou duální neuroinfekce popisovány vzácně, např. je uvedena kazuistika mladého muže se současnou infekcí viry hepatitidy A a E s projevy aseptické meningitidy a elevací aminotransferáz [18]. Další kazuistika uvádí závažnou neuroinfekci s průkazem *Mycobacterium tuberculosis* a *Cryptococcus neoformans* u dosud zdravého mladého muže [19]. V souboru 78 pacientů s neuroinfekcemi, ve kterém byla použita metoda multiplex PCR s detekcí 12 původců, byli 2 původci prokázáni u 5 pacientů [20]. Pneumokok byl prokázán u 4 pacientů, druhým původcem byl enterovirus u 2 pacientů, HSV 1 nebo VZV u třetího a čtvrtého pacienta, u posledního pacienta byla zjištěna současně EBV a HSV 1 [20]. V dalším souboru 181 pacientů s aseptickou meningitidou, kteří byli vyšetřeni metodou multiplex PCR s detekcí 9 původců, byla koinfekce prokázána u 4 pacientů. U 2 pacientů se jednalo o koinfekci HSV 1 a HSV 2, další pacient měl prokázány enteroviry a EBV, u posledního pacienta s HIV infekcí byla zjištěna *Toxoplasma gondii* a HHV 6 [21]. Průkaz herpetických virů navíc může souviset s jejich reaktivací při akutní infekci, jejich klinický význam je nadále sporný. U našich pacientů nebyla prokázána infekce HSV 1 a 2, ostatní herpetické viry nebyly vyšetřovány.

V našem souboru byla zjištěna možná duální infekce u 8 z 34 pacientů (24 %). Jednalo se o kombinaci enterovirů a spirochét u 5 pacientů, neurčeného viru se spirochétou u 1 pacienta a klíšťové encefalitidy s neurčeným virem u 2 pacientů. Uvedené kombinace nejsou v literatuře uvedeny, což ztěžuje jejich interpretaci. Pozoruhodné bylo, že průběh duálních infekcí byl u všech 8 pacientů relativně mírný. Závažný průběh meningoencefalitidy byl zjištěn u pacienta s infekcí virem Cocksackie a u pacientky s izolovaným průkazem spirochét v likvoru, přitom těžký průběh neuroborreliózy s poruchou vědomí je poměrně vzácný [11].

Grantová studie s diagnostikou neuroinfekcí pomocí EM a izolace viru pokračuje i v roce 2013, pokud budou prokázány další nepřesně určené viry, bude zvažována jejich sekvence, což může být zajímavé i z epidemiologického hlediska.

## Závěr

Rutiní použití PCR metody a sérologická diagnostika objasní etiologii většiny aseptických neuroinfekcí. Rozšíření diagnostiky o elektronovou mikroskopii a izolaci viru může zvýšit záchyt možných původců, přesto klinická

interpretace některých výsledků, zejména průkazu spirochét v likvoru a možných duálních infekcí, není dosud jednoznačná.

Podpořeno grantem FN Ostrava č. 1 RVO-FNOs/2012.

## Literatura

- Pícha D, Honegr K, Habanec T. Infekce nervového systému. In: Beneš J. Infekční lékařství. 1. vydání Praha: Galén; 2009, s. 509–533.
- Kazdová K, Hubálek Z. Vyšetření komárů na přítomnost arbovirů na jižní Moravě v letech 2006–2008. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*. 2010;59(3):107–111.
- Retlich F. Invazivní komár *Aedes albopictus* v roce 2012 zachycen v České a Slovenské republice. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*. 2013;22(1):18–21.
- Thompson C, Knee R, Riordan A. Encephalitis in children. *Arch Dis Child*. 2012;97:150–161.
- Ambrose HE, Granerod J, Clewley JP, et al. Diagnostic strategy used to establish etiologies of encephalitis in a prospective cohort of patients in England. *J Clin Microbiol*. 2011;10:3576–3583.
- Tveitnes D, Natås OB, Skadberg Ø, et al. Lyme meningitis, the major cause of childhood meningitis in an endemic area: a population based study. *Arch Dis Child*. 2012;97(3):215–220.
- Stefanoff P, Rogalska J, Zajkowska J, et al. Surveillance of aseptic central nervous system infections in Poland: is it meeting its objectives? *Euro Surveill*. 2011; 16(29):pii=19924. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19924>.
- Petrušová L, Rožnovský L, Mrázek J, et al. Využití molekulárních genetických metod v diagnostice aseptických neuroinfekcí na Klinice infekčního lékařství FN Ostrava v letech 2004–2011. XVI. česko-slovenský kongres o infekčních nemocích. 6.–8. 6. 2012, Ostrava. Sborník abstrakt, s. 79.
- Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Chulchill Livingstone Elsevier 2005; Infectious diseases their etiologic agents, Viral Diseases; pp 1729–2217.
- Dlouhý P, Honegr K, Krbková L, Pícha D, Roháčová H, Štruncová V. Lymeská borrelióza – Doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci. *Klin mikrobiol inf lék*. 2011;17(4):144–153.
- Mygland A, Ljøstad U, Fingerle V, et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol*. 2010;17(1):8–16.
- Derler AM, Eisendle K, Baltaci M, et al. High prevalence of 'Borrelia-like' organisms in skin biopsies of sarcoidosis patients from Western Austria. *J Cutan Pathol*. 2009;36(12):1262–1268.
- Paleček T, Kuchynka P, Hulínska D, et al. Presence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies in patients with new-onset unexplained dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol*. 2010;199(2):139–143.
- Lalosevic D, Lalosevic V, Stojšić-Milosavljević A, et al. Borrelia-like organism in heart capillaries of patient with Lyme-disease seen by electron microscopy. *Int J Cardiol*. 2010;145:e96–98.
- Schwarzová K, Košťanová Z, Holečková K, et al. V. Direct detection of *Borrelia burgdorferi* spirochetes in patients with early disseminated Lyme borreliosis. *Cent Eur J Public Health*. 2009;17(4):179–182.
- Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;49(1):13–21.
- Coyle PK, Schutzer SE, Deng Z, et al. Detection of *Borrelia-burgdorferi* specific antigen in antibody negative cerebrospinal fluid in neurologic Lyme disease. *Neurology*. 1995;45(11):2010–2015.
- Naha K, Karanth S, Prabhu M, et al. Dual infection with hepatitis A and E virus presenting with aseptic meningitis: a case report. *Asian Pac J Trop Med*. 2012; 5(7):587–588.
- Manfredi R, Calza L. Severe brain co-infection with *Cryptococcus neoformans* and *Mycobacterium tuberculosis* in a young, otherwise healthy student recently immigrated from China. *Int J Infect Dis*. 2008;12(4):438–441.
- Shin SY, Kwon KC, Park JW, et al. Evaluation of the Seeplex® Meningitis ACE Detection kit for the detection of 12 common bacterial and viral pathogens of acute meningitis. *Ann Lab Med*. 2012;32(1):44–49.
- Del Prete R, Di Taranto AM, Lipsi MR, et al. Simultaneous detection of viruses and *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid specimens by multiplex polymerase chain reaction-based reverse hybridization assay. *New Microbiol*. 2009;32(2): 143–146.

# Zkušenosti s laboratorní diagnostikou *Clostridium difficile*

L. BAREKOVÁ<sup>1,2</sup>, E. ZÁLABSKÁ<sup>1</sup>, I. HANOVCOVÁ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Oddělení klinické mikrobiologie, Pardubická krajská nemocnice, a. s.,

<sup>2</sup>Katedra epidemiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové, Univerzita obrany, Brno

## SOUHRN

Bareková L., Zálabská E., Hanovcová I.: **Zkušenosti s laboratorní diagnostikou *Clostridium difficile***

**Cíl studie:** *Clostridium difficile* je v současnosti významným původcem nozokomiálních průjmů, v posledních letech narůstá i počet případů infekcí vzniklých v komunitě. Od začátku roku 2010 jsme v Pardubické krajské nemocnici, a. s. (PKN) zaznamenali výrazný nárůst počtu případů infekcí *Clostridium difficile*. Cílem práce bylo popsat a vyhodnotit metody používané v laboratorní diagnostice infekcí *Clostridium difficile* v PKN a popsat používaný laboratorní diagnostický algoritmus.

**Materiál a metody:** Vzorky stolice byly odebrány od symptomatických pacientů hospitalizovaných nebo vyšetřených na ambulancích PKN v období od 1. 7. 2010 do 31. 12. 2012. K detekci glutamát dehydrogenázy (GDH) a toxinu A/B byl použit duální test na principu enzymoimunoeseje C. Diff Quik Chek Complete, Techlab® (D-EIA). Ke konfirmaci byl použit systém GeneXpert PCR Cepheid® (PCR). Od začátku roku 2011 byla prováděna kultivace u všech GDH pozitivních vzorků.

**Výsledky:** Celkem bylo vyšetřeno 2 040 vzorků. D-EIA test byl použit k vyšetření 2 014 vzorků. 1 373 (68,2 %) vzorků bylo GDH a toxin A/B negativní. Ve 359 (17,8 %) vzorcích byla prokázána GDH i toxin A/B. Zjištěná senzitivita a specifita D-EIA testu pro průkaz toxigenního kmene ve vzorku stolice byla 21,8 a 97,2 %. PPV a NPV kalkulovaná pro populaci s prevalencí onemocnění 5, 10, 20, 50 % byla 0,29, 0,46, 0,66, 0,88 a 0,96, 0,92, 0,83, 0,55. Senzitivita a specifita GDH pro detekci *Clostridium difficile* ve stolici byla 100,0 a 96,2 %.

PCR vyšetření bylo celkem provedeno u 140 vzorků. 82 vzorků bylo PCR pozitivních. Gen pro produkci toxinu B byl prokázán ve 47 %, nález suspektní pro ribotyp 027 (gen pro toxin B, binární toxin a delece tcdC) ve 48 %, u 5 % vzorků byl detekován současně gen pro toxin B a gen pro binární toxin.

**Závěr:** Vzhledem k nízké senzitivě EIA testu pro průkaz toxigenního kmene *Clostridium difficile*, pokud je užít jako jediný, byl pro rutinní laboratorní vyšetřování infekcí *Clostridium difficile* na Oddělení klinické mikrobiologie PKN zaveden dvoustupňový testovací algoritmus. Použití D-EIA testu v prvním kroku umožnilo diagnostikovat 86 % vyšetřovaných vzorků během 30 minut jako pozitivní (GDH +; toxin A/B +) nebo negativní (GDH –; toxin A/B –). Vyšetření pomocí PCR ve druhém kroku zvyšuje počet diagnostikovaných případů CDI. Výsledek testu je k dispozici do dvou hodin, což umožňuje rychlé zavedení izolačních opatření na odděleních PKN a adekvátní antibiotickou léčbu pacientů.

**Klíčová slova:** *Clostridium difficile*, GDH (glutamát dehydrogenáza), toxiny, EIA, laboratorní diagnostika, PCR

## SUMMARY

Bareková L., Zálabská E., Hanovcová I.: **Experience with laboratory diagnosis of *Clostridium difficile***

**Background:** *Clostridium difficile* is currently a significant cause of nosocomial diarrhea. For several years, the number of infectious cases in the community has also been increasing. Since the beginning of 2010, quite a large increase in the number of *Clostridium difficile* infections (CDIs) has been noted in Pardubice Regional Hospital (PRH). The objectives of this study were to describe and evaluate the methods used in the laboratory diagnosis of CDIs in PRH, and to describe the laboratory diagnostic algorithm used here.

**Material and methods:** Samples of stools were taken from symptomatic patients hospitalized or examined in the outpatient departments of PRH from 1 July 2010 to 31 December 2012. For the detection of glutamate dehydrogenase (GDH) and toxin A/B, the dual test based upon the principle enzyme immunoassays C. Diff Quik Chek Complete, Techlab® (D-EIA) was used. The system GeneXpert PCR Cepheid® (PCR) was used for confirmation of laboratory findings. Since the beginning of 2011, all the GDH-positive samples were cultured.

**Results:** A total of 2,040 samples were examined. The D-EIA test was used for examination of 2,014 samples. Of those, 1,373 (68.2 %) samples were GDH- and toxin A/B-negative. In 359 (17.8 %) samples, both GDH and toxin A/B were detected. The D-EIA sensitivity and specificity for detecting toxigenic strains in stool samples were 21.8 % and 97.2 %, respectively. The PPV and NPV rates calculated for the populations with prevalence rates of disorders of 5 %, 10 %, 20 % and 50 % were 0.29, 0.46, 0.66, 0.88 and 0.96, 0.92, 0.83, 0.55, respectively. The sensitivity and specificity of GDH for the detection of *Clostridium difficile* in stools were 100.0 % and 96.2 %, respectively.

PCR examination was carried out in 140 samples. Of those, 82 samples were PCR- positive. The gene for the production of toxin B was detected in 47 %, the finding suspected for ribotype 027 (gene for toxin B, binary toxin and deletion of tcdC) in 48 %. In 5 % of the samples, the gene for toxin B and the gene for the binary toxin were detected.

**Conclusion:** Considering the low sensitivity of the D-EIA test for detecting the toxigenic strain of *Clostridium difficile*, if used as the only one, a two-step algorithm was introduced for routine laboratory examination of infections with *Clostridium difficile* in the Clinical Microbiology Department of PRH. In the first step, the D-EIA test diagnosed 86 % of examined samples in 30 minutes as positive (GDH +; toxin A/B +) or negative (GDH –; toxin A/B –). The examination with PCR in the second step increased the number of patients diagnosed with CDI. The test results are available within two hours. This enables quick introduction of isolation measures in the departments of PRH and appropriate antibiotic treatment of the patients.

**Keywords:** *Clostridium difficile*, GDH (glutamate dehydrogenase), toxins, EIA, laboratory diagnosis, PCR

**Adresa:** MUDr. Mgr. Eva Zálabská, Ph.D., Oddělení klinické mikrobiologie, Pardubická krajská nemocnice, a. s., Kyjevská 44, Pardubice 532 02, e-mail: eva.zalabska@nemocnice-pardubice.cz

Došlo do redakce: 19. 7. 2013  
Přijato k tisku: 10. 9. 2013

## Úvod

*Clostridium difficile* je grampozitivní, sporulující, striktně anaerobní bakterie. Hlavním faktorem patogenity jsou toxiny označované A (TcdA, enterotoxin) a B (TcdB, cytotoxin). Některé kmeny produkují binární toxin CDT, jehož význam je v patogenezi infekce zatím nejasný. Podle produkce těchto toxinů se kmeny rozdělují do sedmi typů, nejčastěji se vyskytují A+B+CDT<sup>-</sup>, A+B+CDT<sup>+</sup>, A–B+CDT<sup>-</sup>. Kmeny produkující pouze toxin A nebyly dosud popsány. Kmeny neprodukující žádný z těchto toxinů jsou považovány za nepatogenní [1]. Toxigenní kmeny *Clostridium difficile* patří v současnosti v Evropě mezi významné původce nozokomiálních průjmů. Infekce *Clostridium difficile* (CDI) vzniká často v návaznosti na předchozí léčbu antibiotiky, v některých případech může být infekce život ohrožující [2,3]. V posledních letech vzrůstá počet případů CDI, které vznikají v komunitě [4,5].

Průkaz toxigenního kmene je pro potvrzení klinické diagnózy nezbytný. Za zlatý standard v laboratorní diagnostice je stále považován průkaz cytopatického efektu na tkáňových kulturách s neutralizačním testem (CCA) a toxigenní kultivace (CT). Pro náročnost provedení a časovou náročnost jsou tyto metody vyhrazeny specializovaným pracovištím. První z těchto metod detekuje přítomnost toxinů ve stolici, druhá detekuje kmen *Clostridium difficile* se schopností produkce toxinů. Nejrozšířenější se v posledních letech staly imunoenzymatické a imunochromatografické testy, které detekují přítomnost toxinu A nebo obou toxinů (A i B). Tyto testy jsou rychlé, snadno proveditelné, ale pokud jsou použity v diagnostice jako jediné, vykazují nízkou senzitivitu a specifitu. Přesnost diagnostiky CDI zvyšuje použití dvoustupňového nebo třístupňového algoritmu, kde jsou kombinovány různé metody. Určení glutamát dehydrogenázy (GDH), exoenzymu charakteristického pro *Clostri-*

*dium difficile*, je považováno za optimální test pro vyřazení *Clostridium difficile* negativních vzorků. V případě pozitivity tohoto testu je nutné použít další doplňující testy, jako průkaz toxinů, kultivaci nebo PCR [3,6–10].

Od února roku 2010 jsme v naší nemocnici zaznamenali nárůst počtu pacientů s CDI. Dle nemocničního systému hlášení nozokomiálních infekcí byla incidence nozokomiálních případů CDI v roce 2010 4,6 případu na 1 000 ošetřovacích dnů (OD), problematika CDI byla v naší nemocnici vysoce aktuální i v roce 2012 (4,4 případu na 1 000 OD).

## Materiál a metody

Vzorky stolic byly odebrány od pacientů hospitalizovaných nebo ošetřených ambulantně v PKN v období od 1. 7. 2010 do 31. 12. 2012 a vyšetřeny na Oddělení klinické mikrobiologie (OKM). Do sterilního kontejneru byly odebrány minimálně dva mililitry průjmovité stolice. Pokud nebylo možno doručit vzorek stolice do dvou hodin do laboratoře, byl uchovávan při chladničkové teplotě 5 °C a byl zpracován nejpozději do 12 hodin od odběru [11]. Výtěr z rektu byl odebrán na tampón typu flocked swab určený pro PCR a zpracován systémem GeneXpert PCR Cepheid® (viz níže). K detekci GDH a toxinu A/B byl použit duální test na principu enzymoimunoeseje C. Diff Quik Chek Complete, Techlab®(D-EIA). Tento test prokazuje souběžně, ale nezávisle GDH a toxiny A a B. Zpracování vzorku stolice a vyhodnocení probíhalo dle instrukcí výrobce.

Při kultivaci stolice jsme postupovali dle návodu zveřejněného ve Zprávách CEM Pracovní skupinou pro *Clostridium difficile* při NRL pro antibiotika v roce 2008. Stolice cca o objemu 0,5 ml byla smísená s 0,5 ml 95% alkoholu, inkubována při pokojové teplotě 40 minut a po centrifugaci inokulována na plotnu s kultivační půdou (*Clostridium di-*

Tabulka 1  
Senzitivita, specifita, NPV, PPV – C. Diff Quik Chek Complete

Metoda	Počet vzorků				%			
	TP	FP	TN	FN	senzitivita	specifita	PPV	NPV
toxin A/B	17	1	35	61	21,8	97,2	94,4	36,5
GDH	88	1	25	0	100	96,2	98,9	100

TP – pravdivě pozitivní, FP – falešně pozitivní, FN – falešně negativní, TN – pravdivě negativní, NPV – negativní prediktivní hodnota testu, PPV – pozitivní prediktivní hodnota testu

*difficile* agar base, Moxalatom Norfloxacin selective supplement, Oxoid). Inkubace probíhala v anaerobním prostředí, při teplotě 37 °C 72 hodin. V případě negativního kulti-vačního nálezu byla kultivace prodloužena na 96 hodin. Narostlé kolonie byly konfirmovány mikroskopicky po obarvení dle Grama a komerčními testy ANAEROTest 23 firmy Lachema nebo latexovou aglutinací (*Clostridium difficile* LATEX Test Kit, Oxoid).

Systém GeneXpert PCR Cepheid® (PCR). Systém detekuje na principu RT-PCR geny pro produkci toxinu B, binárního toxinu a pro ribotyp 027 charakteristickou delecí nukleotidu 117 v genu fungujícím jako negativní regulátor produkce toxinů (tcdC). Při práci se soupravou bylo postupováno dle návodu výrobce.

Vzorky průjmovité stolice byly v laboratoři vyšetřovány primárně pomocí soupravy D-EIA. Ve dvou případech nebylo možno vzhledem ke klinickému průběhu onemocnění odebrat vzorek průjmovité stolice, a proto byl vyšetřen pouze výtěr z rektu pomocí PCR. Ve 22 dalších případech, kdy byla nezbytná rychlá diferenciální diagnostika, byla průjmovitá stolice vyšetřena pouze pomocí PCR bez stanovení GDH a toxinů A/B ve stolici. Vzorky GDH a toxin A/B negativní nebyly rutinně dále vyšetřovány a byly považovány za definitivně negativní. Na začátku sledovaného období, vzhledem k našim malým dosavadním zkušenostem s laboratorní diagnostikou *Clostridium difficile* a vzhledem ke klinickému průběhu onemocnění, byl negativní nález u 25 vzorků GDH a toxin A/B negativních potvrzen pomocí PCR. U 17 pacientů, i přes výsledek vyšetření GDH pozitivní, toxin A/B pozitivní, bylo klinikem požadováno PCR vyšetření. Všechny ostatní GDH pozitivní a toxin A/B pozitivní vzorky byly označeny jako definitivně pozitivní a nebyly dále rutinně vyšetřovány. U vzorků GDH pozitivních, toxin A/B negativních byla snaha doplnit vyšetření pomocí PCR k ověření, zda jde o přítomnost toxigenního kmene *Clostridium difficile* ve stolici. Po kontaktu s ošetřujícím lékařem, na základě klinické a epidemiologické rozvahy bylo eventuálně vyšetření pomocí PCR doplněno.

Kultivace *Clostridium difficile* je prováděna od začátku roku 2011 u všech GDH pozitivních vzorků pro případnou možnost typizace kmene nebo vyšetření citlivosti k antibiotikům u klinicky závažných infekcí.

V našem souboru jsme definovali senzitivitu, specificitu, negativní prediktivní hodnotu (NPV) a pozitivní prediktivní hodnotu (PPV) EIA testu pro průkaz toxigenního kmene ve vzorku stolice. Jako pravdivě pozitivní vzorky byly definovány ty vzorky, u kterých byly současně pozitivní alespoň tři ze čtyř provedených testů (GDH, toxin A/B, PCR, pozitivní kulti-vační průkaz kmene). Jako pravdivě negativní byly označeny vzorky, u kterých byly současně negativní alespoň tři ze čtyř provedených testů. Ve vzorcích, které byly GDH pozitivní, toxin A/B negativní, kulti-vačně pozitivní a PCR negativní byl výsledek vyšetření interpretován jako nález netoxigenního kmene a tyto vzorky byly považovány za pravdivě negativní. Pro výpočet senzitivity, specificity, NPV, PPV stanovení GDH pro detekci *Clostridium difficile* ve stolici byly jako pravdivě pozitivní označeny vzorky, kde byly pozitivní alespoň dva ze čtyř testů a pravdivě negativní ty, kde byly negativní alespoň tři ze čtyř testů. PPV a NPV EIA testu pro průkaz toxinů A/B byla kalkulována

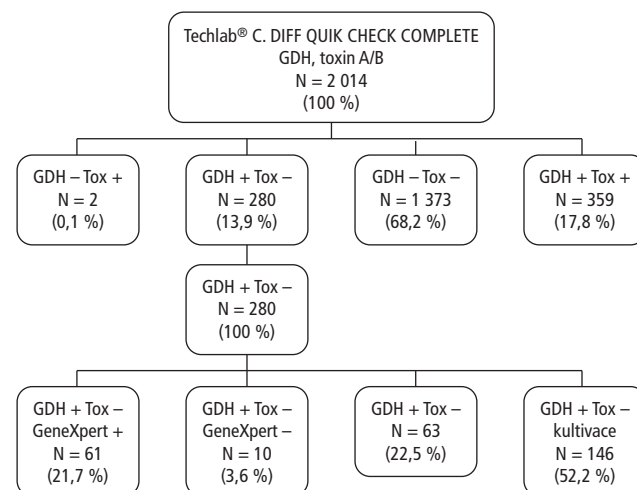
pro různou prevalenci CDI (5, 10, 20 a 50 %) v testované populaci [15].

## Výsledky

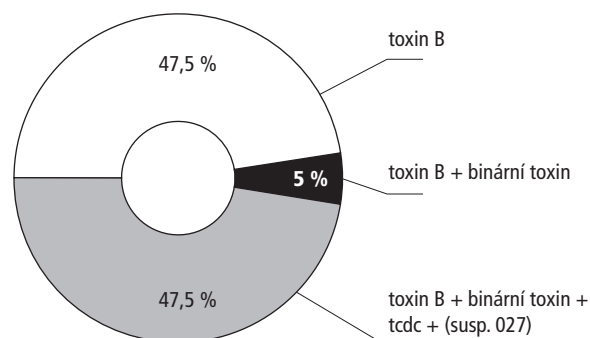
V období od 1. 7. 2010 do 31. 12. 2012 bylo do naší laboratoře doručeno k vyšetření celkem 2 038 vzorků průmovité stolice a dva výtěry z rektu. D-EIA test byl použit k vyšetření 2 014 vzorků. U 1 373 (68,2 %) vzorků byla GDH a toxin A/B negativní. U 359 (17,8 %) vzorků byla prokázána ve stolici GDH i toxin A/B. U dvou (0,1 %) vzorků GDH negativní a toxin A/B pozitivní nebylo PCR vyšetření klini-ckem požadováno, vzorky byly na základě negativního kulti-vačního nálezu hodnoceny jako falešná pozitivita toxinu A/B (obr. 1).

U 280 (13,9 %) vzorků GDH pozitivních, toxin A/B negativních bylo v 71 případech doplněno vyšetření PCR,

Obr. 1  
Výsledky vyšetření vzorků stolice dle použitých metod



Graf 1  
Průkaz genů pro produkci toxinů pomocí systému GeneXpert 1. 7. 2010 až 31. 12. 2012, n = 82





u 146 vzorků byla doplněna pouze kultivace, u 63 vzorků nebylo žádné další vyšetření doplněno. U 71 vzorků GDH pozitivních, toxin A/B negativní, kde bylo po dohodě s klinikem provedeno PCR vyšetření, byl v 61 případech prokázán toxigenní kmen *Clostridium difficile*. V 10 případech bylo PCR negativní, vzhledem k současné pozitivní kultivaci vzorku stolice byl laboratorní nález v 9 případech interpretován jako průkaz netoxigenního kmene *Clostridium difficile* ve stolici. V jednom vzorku stolice nebylo *Clostridium difficile* kultivačně prokázáno a tento nález byl hodnocen jako falešná pozitivita GDH (obr. 1).

PCR byla celkem provedena u 140 vzorků. U 26 vzorků bylo provedeno pouze PCR vyšetření bez stanovení GDH a toxinu A/B. Průkaz toxigenního kmene *Clostridium difficile* ve stolici pomocí PCR byl zaznamenán u 82 vzorků. Gen pro produkci toxinu B byl prokázán ve 47 % vzorků, nález suspektní pro ribotyp 027 (gen pro toxin B, binární toxin a delece *tdcC*) ve 48 %. V 5 % vzorků jsme detekovali současně gen pro toxin B a gen pro binární toxin (graf 1).

Celkem u 114 vzorků byly provedeny všechny testy (D-EIA test, PCR, kultivace). Výsledky senzitivity a specificity, NPV a PPV pro EIA toxin A/B a GDH uvádí tabulka 1 a 2.

Tabulka 2

C. Diff Quik Chek Complete  
NPV a PPV EIA toxin A/B – kalkulace dle prevalence CDI  
v testované populaci

Prevalence	NPV	PPV
5 %	0,96	0,29
10 %	0,92	0,46
20 %	0,83	0,66
50 %	0,55	0,88

NPV – negativní prediktivní hodnota testu, PPV – pozitivní prediktivní hodnota testu, CDI – infekce *Clostridium difficile*

## Diskuze

Infekce *Clostridium difficile* představuje pro zdravotnické zařízení medicínský a epidemiologický problém. Z hlediska včasné a adekvátní léčby pacientů a prevence nozokomiálního přenosu infekce je nezbytné, aby laboratorní diagnostika byla rychlá a přesná [2,11].

Průkaz toxinů A/B ve stolici metodou EIA, pokud je užíván samostatně, vykazuje nízkou senzitivitu. Zjištěná senzitivita udávaná různými autory je ovlivněná použitou referenční metodou. Pohybuje se od 72 % do 93 % při porovnání s CCA. Pokud je jako referenční metoda použita toxigenní kultivace, pohybuje se senzitivita od 32 % do 86 % [3,7–9,13]. V našem souboru jsme v souladu s literaturou zjistili nízkou senzitivitu EIA testu pro průkaz toxinu A/B ve stolici, která se blíží senzitivě zjištěné při použití toxigenní kultivace jako referenční metody. Dle našeho názoru je to dáno tím, že PCR, stejně jako toxigenní kultivace, prokazuje ve stolici přítomnost kmene *Clostridium difficile* se schopností produkce toxinů (toxigenní kmen), nikoliv přítomnost toxinů ve stolici jako CCA. Průkaz toxigenního kmene ve stolici bez pozitivního záchytu toxinů ve stolici je některými autory považován za obraz kolonizace pacienta toxigenním kmenem [13]. Dle jiné práce nekoreluje přítomnost toxinů ve stolici detekovaná EIA testem s tíží klinického obrazu a u pacientů s těžkým a středně těžkým průběhem onemocnění se senzitivita EIA testu nezvyšuje [14]. Toto zjištění je v souladu i s našimi pozorováními. Tabulka 3 udává výsledky D-EIA a PCR u tří vybraných pacientů hospitalizovaných v naší nemocnici s těžkým průběhem CDI. Ačkoliv není opakovaný odběr vzorků stolice v průběhu jedné epizody doporučován a efekt léčby a nutnost izolačních opatření se posuzuje výhradně dle klinického stavu pacienta, na některých odděleních byly na začátku sledovaného období prováděny opakované odběry [3,13,16]. Zaznamenali jsme, že i u pacientů s klinickým obrazem těžké CDI byl průkaz toxinů A/B negativní. Domníváme se, že důvodem může být na jedné straně nízká senzitivita D-EIA testu pro průkaz toxigenního kmene ve stolici, na druhé straně i chyby v preanalytické fázi, především nedodržení doby transportu vzorku stolice do laboratoře nebo nesprávné

Tabulka 3

Laboratorní a klinické nálezy u vybraných pacientů s opakovaným vyšetřením

Pacient	Datum	GDH	Toxin A/B	GeneXpert	Klin. obraz CDI	Počet leukocytů v periferní krvi v tisících/mm <sup>3</sup>
č. 1	28. 5. 2011	pozitivní	pozitivní	nt	ano	48
	29. 5. 2011	pozitivní	negativní	nt	ano	45
č. 2	19. 7. 2010	pozitivní	pozitivní	nt	ano	22
	23. 7. 2010	pozitivní	negativní	nt	ano	17
	26. 7. 2010	pozitivní	pozitivní	nt	ano	23
č. 3	17. 6. 2011	pozitivní	pozitivní	pozitivní	ano	17
	19. 6. 2011	pozitivní	negativní	nt	ano/septický stav	16

nt – netestováno, CDI – infekce *Clostridium difficile*



skladování vzorku odebraného na oddělení mimo pracovní dobu OKM. Z tohoto důvodu považujeme za zásadní vždy vztahovat laboratorní výsledky ke klinickému stavu pacienta.

Námi zjištěná specifická EIA testu pro průkaz toxinů je 97,2 % a je v souladu s daty zjištěnými jinými autory [3,7–9,13].

NPV a PPV testu EIA pro průkaz toxinů je ovlivněna prevalencí CDI v testované populaci (*tabulka 2*) [3]. Pokud je testována populace s prevalencí 50 % (epidemický výskyt), je PPV akceptovatelná, v endemické situaci (prevalence 5–10 %) je PPV nízká, což je spojeno s nadbytečnou léčbou pacientů bez CDI. NPV EIA testu toxin A/B je v endemické situaci vysoká, při epidemickém výskytu je signifikantně nižší, nízká NPV znamená, že některé případy CDI nebudou zachyceny. To vede k nedostatečné léčbě a k šíření infekce z důvodu chybějících izolačních opatření [3].

U EIA testu pro průkaz GDH byla zjištěna shodně s literaturou vysoká senzitivita, specifická a vysoká NPV (*tabulka 1*) [7,10].

39 PCR pozitivních vzorků bylo systémem GeneXpert označeno jako suspektní ribotyp 027. Domníváme se ale, že se jednalo o ribotyp 176, jehož epidemický výskyt byl popsán ve východních Čechách a na Moravě [17].

## Závěr

Pro rutinní diagnostiku CDI byl v naší laboratoři nastaven diagnostický algoritmus. Vzorky stolice jsou primárně testovány pomocí soupravy D-EIA. GDH negativní, toxin A/B negativní vzorky jsou považovány za definitivně negativní a nejsou dále testovány. Výsledek GDH pozitivní, toxin A/B pozitivní je považován za pozitivní průkaz toxigenního kmene CD s průkazem toxinů ve stolici, ošetřující lékař je informován o nutnosti izolace pacienta a je doporučena antibiotická terapie CDI. V případě výsledku GDH pozitivní, toxin A/B negativní je snaha, po domluvě s ošetřujícím lékařem, doplnit vyšetření pomocí PCR k průkazu přítom-

nosti toxigenního kmene ve stolici. Pokud je prokázán toxigenní kmen *Clostridium difficile* doporučujeme okamžitou izolaci pacienta a u symptomatických pacientů i ATB léčbu CDI.

## Literatura

1. Rupnik M. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008;32:541–555.
2. Freeman J, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:529–549.
3. Crobach MJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:1053–1066.
4. Lessa FC. Community-associated *Clostridium difficile* infection: How real is it? *Anaerobe* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.01.006>
5. Khanna S, et al. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am J Gastroenterol.* 2012;107:89–95.
6. Larson AM, Fung AM, Fang FC. Evaluation of tcdB real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(1):124–130.
7. Novak-Weekley SM, et al. *Clostridium difficile* Testing in the Clinical Laboratory by Use of Multiple Testing Algorithms. *J Clin Microbiol.* 2010;48(3):889–893.
8. Quinn CD, et al. C. Diff Quik Chek complete enzyme immunoassay provides a reliable first-line method for detection of *Clostridium difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):603–605.
9. Culbreath K, Ager E, Nemeyer R J, Kerr A, Gilligan PH. Evolution of Testing Algorithms at a University Hospital for Detection of *Clostridium difficile* Infections. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):3073–3076.
10. Sharp SE, et al. Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *clostridium difficile* disease. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2082–2086.
11. Beneš J, Husa P, Nyč O. Doporučený postup diagnostiky a léčby kolitidy vyvolané *Clostridium difficile*. *Klin Mikrobiol Inf Léč.* 2012;18(5):160–167.
12. Matějková J, Nyč O, Melter O. Zkušenosti s využitím nových testů v diagnostice *Clostridium difficile*. *Klin Mikrobiol Inf Léč.* 2010;16(3):90–92.
13. Wilcox MH. Overcoming barriers to effective recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(Suppl. 6):13–20.
14. Humphries RM, Uslan DZ, Rubin Z. Performance of *Clostridium difficile* Toxin Enzyme Immunoassay and Nucleic Acid Amplification Tests Stratified by Patient Disease Severity. *J Clin Microbiol.* 2012;51(3):869–873.
15. Vránová J, Horák J, Krátká K, Hendrichová M, Kovářiková K. ROC analýza nákladů a přínosů k určení optimálního dělicího bodu. *Čas Léč čes.* 2009;148(9):410–415.
16. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, et al. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and non epidemic strains of *Clostridium difficile* among long-term care facilities. *Clin Infect Dis.* 2007;45:992–998.
17. Nyč O, Pituch H, Matějková J, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 176 in the Czech Republic and Poland. *Lancet.* 2011;377(9775):1407.

# Trpasličí kmeny – Small colony variants *Staphylococcus aureus*

J. TKADLEC, O. MELTER

Ústav lékařské mikrobiologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha

## SOUHRN

Tkadlec J., Melter O.: **Trpasličí kmeny – Small colony variants *Staphylococcus aureus***

Fenomén trpasličích kmenů *S. aureus*, tzv. *Small Colony Variants* (SCV), je spojen s chronickými a rekurentními stafylokokovými infekcemi. Tyto fenotypové varianty se liší od kmenů *S. aureus* s běžným fenotypem nejčastěji velikostí kolonií, jejich morfologií, pigmentací a dalšími znaky, ale také molekulárně genetickými změnami. Příčinou vzniku SCV fenotypu je často mutace v některém z důležitých metabolických či regulačních genů, která je spojena s auxotrofií. Z klinického hlediska je významná zvýšená schopnost SCV kmenů odolávat antibiotické léčbě, zapříčiněná jednak rezistencí k určitým antibiotikům spojenou s příčinou SCV fenotypu a také se schopností těchto kmenů perzistovat uvnitř hostitelských buněk.

**Klíčová slova:** *Staphylococcus aureus*, SCV, chronické infekce, intracelulární perzistence

## SUMMARY

Tkadlec J., Melter O.: **Dwarf colonies – Small colony variants *Staphylococcus aureus***

The phenomenon of dwarf colonies of *S. aureus*, the so-called small colony variants (SCVs), is associated with chronic and recurrent staphylococcal infections. Most frequently, these phenotypic variants differ from normal strains of *S. aureus* in colony size, morphology, pigmentation and other characteristics as well as molecular genetic changes. SCVs frequently emerge as a result of mutations in metabolically important and regulatory genes. The mutations are a cause of SCVs auxotrophy. From a clinical point of view, an increased ability of SCVs to resist antibiotic therapy and also an ability to persist within eukaryotic host cells are of importance.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, SCV, chronic infections, intracellular persistence

*Klin mikrobiol inf lék 2013;19(3):96–102*

**Adresa:** Mgr. Jan Tkadlec, Ústav lékařské mikrobiologie, 2. LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, e-mail: tkadlecjan@gmail.com

Došlo do redakce: 21. 3. 2013

Přijato k tisku: 31. 8. 2013

## Úvod

*Staphylococcus aureus* je velmi úspěšný oportunní patogen, který běžně kolonizuje kůži a sliznice až 30 % zdravé populace [1]. Úspěšnost této bakterie, jako infekčního agens, je podmíněna schopností produkce široké škály enzymů a toxinů, které usnadňují kolonizaci a infekci tkání hostitele, ale také častou rezistencí k mnoha antibiotikům. Zvyšující se výskyt *S. aureus* rezistentního k meticilinu (MRSA – *Methicillin Resistant S. aureus*), zejména v souvislosti s nozokomiálními infekcemi, patří k nejvýznamnějším problémům dnešní medicíny [2]. Objevuje se také problém komunitních infekcí způsobených MRSA kmeny, jejichž počet narůstá [3].

*S. aureus* může být původcem řady onemocnění, včetně život ohrožujících infekcí, jako je osteomyelitida, pneumonie, sepse nebo endokarditida [4]. Některé z těchto infekcí mají rekurentní či chronický charakter se závažnými důsledky pro zdravotní stav pacienta a kvalitu jeho života. K nejzávažnějším chronickým stafylokokovým infekcím řadíme chronické osteomyelitidy či infekce kloubních náhrad

a jiných implantátů, u kterých je často v důsledku exacerbace infekce nutné kromě opakované antibiotické terapie také chirurgický zásah [5]. Dalším případem chronické infekce je infekce dýchacích cest u pacientů s cystickou fibrózou. Tito pacienti jsou ve většině případů již v raném věku infikování *S. aureus* a tato bakterie je následně izolována ze vzorků jejich sput po řadu let [6]. Významným faktorem při vzniku chronických infekcí je neefektivní či nevhodná antibiotická léčba, respektive selekce rezistentních kmenů v důsledku takové terapie. Paleta mechanismů zvyšujících odolnost *S. aureus* k antibiotikům je velmi pestrá, zahrnuje například přítomnost efluxních pump (př. MsrA), enzymů modifikujících cílové místo antibiotika (př. Erm metylázy) nebo samotné antibiotikum (př. MphC fosfotransferáza) či náhradu k antibiotiku citlivého enzymu za rezistentní formu (PBP2a u MRSA) [7]. Kromě uvedených mechanismů rezistence je schopen *S. aureus* odolat antibiotické léčbě také tvorbou fenotypových variant se sníženou citlivostí k antibiotikům, jako jsou tzv. SCV (*Small Colony Variants*), někdy také nazývané trpasličí kmeny (*Dwarf colonies*) nebo dříve

„*G (gonidial) variants*“, neboť se předpokládalo, že se jedná o určitý typ odolných buněk podobných sporám (gonidia) [8]. Proti výše jmenovaným mechanismům je tento způsob odolnosti k antibiotikům mnohem komplexnější co do příčin, tak i důsledků. U SCV kmenů se často vyskytuje rezistence spojená s určitým antibiotikem použitým pro jejich léčbu (kotrimoxazol, aminoglykosidy – obzvláště gentamicin). Příčinou vzniku i rezistence SCV kmenů je v mnoha případech spontánní mutace. V důsledku této mutace dochází ke změně fyziologie bakteriální buňky. Výsledkem mutace může být vyřazení metabolické dráhy, na kterou dané antibiotikum účinkuje (kotrimoxazol). Nebo může být mutace příčinou změny fyzikálně-chemických vlastností buňky, která narušuje základní podmínky pro účinek antibiotika (zabránění vstupu antibiotika do buňky kvůli změně membránového potenciálu – aminoglykosidy) [8]. Výsledky z posledních let navíc dokazují schopnost SCV kmenů dlouhodobě perzistovat uvnitř eukaryotických buněk [9]. Intracelulární lokalizace pomáhá SCV kmenům odolat působení antibiotik, ale také se bránit působení imunitního systému hostitele. Tyto faktory mohou vést k selhání léčby, kdy se bakterie mohou *in vitro* jevit jako citlivé k testovanému antibiotiku, nicméně *in vivo* vykazují rezistenci.

### Charakterizace a výskyt SCV kmenů

Fenomén trpasličích kolonií není omezen pouze na stafylokoky, byl popsán i u řady dalších, jak grampozitivních, tak i gramnegativních bakterií. Poprvé byl SCV fenotyp popsán již v roce 1910 u *Salmonella typhi*. Dále byly popsány SCV kmeny *Staphylococcus epidermidis*, *S. capitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* sp., *Brucella melitensis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Serratia marcescens* a *Neisseria gonorrhoeae*. Tyto fenotypové varianty byly kultivovány z klinických vzorků původem z abscesů, krve, kostí a kloubů, respiračního traktu či měkkých tkání [8].

Trpasličí kmeny *S. aureus* jsou izolovány často od pacientů s chronickou infekcí, jako je osteomyelitida, Darierova choroba (chronická, geneticky podmíněná kožní nemoc) nebo infekce dýchacích cest při cystické fibróze. Byly také popsány případy sepsí a abscesů vyvolaných těmito kmeny, dávané do souvislosti s operacemi, které proběhly i několik let před propuknutím samotné infekce [10]. V některých případech vykazovaly izolované SCV kmeny charakteristiky nozokomiálních nákaz [11]. Tyto kmeny byly navíc často rezistentní k met icilinu a řadě dalších antibiotik [11].

V případě SCV kmenů se setkáváme s bakteriální subpopulací, která je na základě specifických fenotypových a patogenních vlastností odlišitelná od mateřského NCV (*Normal Colony Variant*) kmene. Charakterizovány jsou typicky jako drobné, nehemolytické, nepigmentované kolonie. U thymidin-auxotrofních (viz níže) SCV se vyskytují dva typy kolonií tzv. „fried-egg“ (tvar „volského oka“) kolonie se slabými průhlednými okraji obklopující drobný pigmentovaný střed, druhým typem jsou tzv. „pinpoint“ (tvar špičky špendlíku) kolonie – drobné kolonie přibližně desetkrát menší než kolonie mateřského kmene. Na mikroskopické úrovni je zřejmá narušená separace buněk při dělení a po Gramově barvení se buňky SCV kmenů jeví jako

pleomorfní koky připomínající nepatogenní mikrokoky. Elektronová mikroskopie odhaluje heterogenní shluky obsahující abnormálně velké koky a agregáty nekompletně oddělených buněk [12].

SCV kmeny jsou často auxotrofní k thymidinu, heminu, menadionu nebo thiaminu. Může se také vyskytovat auxotrofie dvojitá – thymidin/menadion nebo thymidin/hemin [13,14]. Po suplementaci auxotrofním požadavkem rostou SCV kmeny jako NCV *S. aureus*. Častá je také reverze k NCV fenotypu po kultivaci *in vitro* [15]. Srovnání mateřského NCV a odvozeného SCV kmene viz obr. 1.

### Příčiny SCV fenotypu

SCV kmeny jsou definovány na základě fenotypových vlastností (pomalý růst, ztráta pigmentace a hemolýzy atd.), a přestože tyto kmeny sdílí i mnoho molekulárně biologických vlastností [16], jedná se o velmi rozmanitou skupinu z hlediska původu a příčiny jejich vzniku.

U většiny SCV kmenů *S. aureus* je často prokazována auxotrofie a s příčinou auxotrofie se spojuje i původ vzniku těchto kmenů. Nejčastěji se jedná o auxotrofii k menadionu, heminu a thymidinu. Byly ale také popsány kmeny auxotrofní k CO<sub>2</sub> [11] a u některých kmenů nebyla auxotrofie prokázána vůbec [17]. Jako příčiny auxotrofie či obecně SCV fenotypu, i tam, kde nebyla auxotrofie prokázána, byly popsány genetické změny, zejména mutace v klíčových metabolických a regulačních genech. Ke genům, jejichž mutace mohou být příčinou SCV fenotypu, patří geny kódující enzymy podílející se na syntéze komponent dýchacího řetězce, například *hemB* [18], *menB* [19] a *ctaA* [20] nebo gen enzymu thymidylát-syntázy *thyA*, podílející se na syntéze purinů a pyrimidinů [21]. U některých SCV kmenů byly popsány také mutace dalších genů, jako například genu *relA* kódujícího regulační komponentu stringentní odpovědi, dále genu *rlmN* kódujícího ribozomální metyl-transferázu metylující 23S rRNA v pozici A2503 [17] nebo mutace v genu sukcinát dehydrogenázy *sdh* [22]. Recentně Cui et al. do detailu popsali SCV kmen izolovaný od pacienta s opakující

Obr. 1

Srovnání růstu mateřského NCV a odvozeného SCV kmene (krevní agar Columbia). Vlevo SCV kmen. Vpravo NCV kmen. Oba kmeny pocházejí ze stejného vzorku z respiračního traktu pacienta s cystickou fibrózou.





se stafylokokovou infekcí následující po chirurgickém zákroku. Kromě SCV izolátu byl od stejného pacienta izolován také klonálně shodný NCV izolát. Genomy obou izolátů byly sekvenovány a na základě jejich srovnání byla jako příčina vzniku SCV a zpětné reverze k normálnímu fenotypu označena inverze velké části genomu (tzv. flip-flop) mezi homologními sekvencemi ostrovů patogenity SAPIm4 a SAPIm1 [23].

Selekční tlak antibiotické léčby je pro objevení se SCV kmenů klíčový. Tyto kmeny jsou ve své podstatě metabolicky defektní a za běžných podmínek neobstojí v kompetici s bakteriemi s normálním fenotypem. Právě situace, kdy je populace bakterií vystavena intenzivní antibiotické léčbě, vytváří podmínky pro uplatnění SCV kmenů (viz obr. 2). To dokazují jednak popisy SCV kmenů izolovaných od pacientů podstupujících intenzivní antibiotickou léčbu [24,25], jednak popisy indukce SCV fenotypu vystavením selekčnímu tlaku antibiotik *in vitro* [26]. Kromě působení antibiotik může být selekčním tlakem vedoucím k objevení SCV fenotypu i mezidruhová kompetice bakterií. Koinfekce *S. aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* při infekci dýchacích cest je u pacientů s cystickou fibrózou, od nichž byl izolován SCV kmen *S. aureus*, mnohem častější než u ostatních pacientů [25]. *P. aeruginosa* produkuje řadu exoproduktů, které mají negativní účinek na grampozitivní bakterie, včetně *S. aureus*. Tyto exoprodukty, například 4-hydroxy-2-heptylquinolin-N-oxid (HQNO), působí často na elektrontransportní řetězec, následkem čehož jsou selektovány mutanty s naru-

šeným elektrontransportním řetězcem, jako jsou hemin autotrofní SCV kmeny [27]. Působení HQNO na *S. aureus in vitro* vedlo nejenom k zvýšenému výskytu SCV kmenů a zároveň rezistence k aminoglykosidům (pro jejichž transport je nezbytný elektrontransportní řetězec), ale mělo za následek i zvýšenou tvorbu biofilmu [28].

### Molekulárně biologické vlastnosti SCV kmenů

Na proteomové úrovni jsou také patrné rozdíly mezi SCV a NCV *S. aureus*. Snížená produkce hemolyzinů je znatelná již při růstu SCV kmenů na krevním agaru [13,29]. V souladu se sníženou produkcí hemolyzinů je prokazatelná i nižší cytotoxická aktivita SCV kmenů na buněčných kulturách [30]. Na úrovni exprese jednotlivých toxinů je detekovatelná snížená produkce alfa hemolyzinu, proteolytických enzymů a některých exotoxinů, související se sníženou hladinou RNAIII, tj. efektorovou molekulou *agr* systému kontrolujícího expresi genů virulence. Na druhou stranu je u SCV kmenů zvýšená hladina sigma faktoru B, regulačního proteinu řídicího odpověď na nespecifický stres, a tím je zvýšena i exprese řady genů jím regulovaných [31]. V důsledku aktivace sigma B odpovědi je zvýšena exprese adhezínů FnbA a FnbB (fibronectin vazebné proteiny), což vede k zesílení vazby bakterie na povrch epitelů a ke zvýšení pravděpodobnosti průniku do vnitrobuněčného prostoru hostitelských buněk, tedy i možnosti intracelulární perzistence [32].

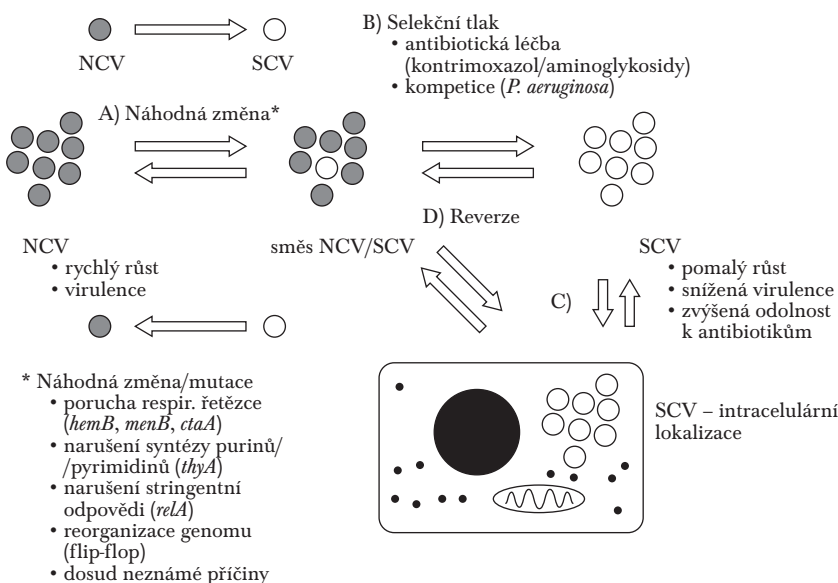
Exprese adhezínu je kontrolována jak *agr* systémem (inhibice exprese), tak pomocí sigma B (aktivace exprese). Rovněž byla zdokumentována zvýšená exprese proteinů oxidativního stresu AphC, AphF (C a F podjednotky alkyhydroperoxid reduktázy) a DNA vazebného proteinu Dps, jejichž expresi řídí regulátor PerR. Zvýšená exprese proteinů chránících SCV před oxidativním stresem může být významným faktorem při ochraně před reaktivními formami kyslíku produkovanými imunitními buňkami hostitele [16].

Z hlediska metabolismu byla u SCV kmenů ve srovnání s NCV *S. aureus* prokázána snížená exprese enzymů podílejících se na Krebsově cyklu, pentozofosfátovém cyklu a také enzymů metabolismu purinů, pyrimidinů a folátu. U některých typů SCV (*in vitro* připravená *hemB* mutanta a gentamicinem indukované SCV), nikoliv však u klinického izolátu, byla zároveň zvýšená exprese glykolytických enzymů. Zajímavé je, že i když u spontánních mutantů k normálnímu fenotypu byla reverze spojená s dílčím zvýšením exprese enzymů Krebsova cyklu a zároveň snížením exprese proteinů podílejících se na ochraně před oxidativním stresem, z celkového hlediska si revertanti udržovali expresní

Obr. 2

#### Schéma vzniku SCV kmenů

Buňky s vlastnostmi SCV kmenů vznikají náhodně v populaci NCV kmene v důsledku spontánních změn, například mutací (A). Selektivní tlak (antibiotická léčba, kompetice s jinými druhy) může vést k převládání SCV kmene v populaci (B). SCV kmeny mohou pronikat do buněk hostitele a perzistovat v nich, důsledkem je chronická povaha infekce (C). Reverzní mutace může vést k obnovení NCV fenotypu a obnovení akutní infekce (D).



profil velmi podobný SCV [16]. U určitých typů SCV (*hemB* mutanta) může hrát důležitou roli v metabolismu také zvýšená exprese některých komponent arginin-deimina-zové dráhy. Tato dráha se účastní anaerobního metabolismu a může SCV kmenům pomáhat při neutralizaci kyselého intracelulárního prostředí. Předpokládá se také, že tato dráha může generovat ATP [33].

### Auxotrofie k menadionu a heminu – mutanty s poruchou dýchacího řetězce

Jednou ze známých příčin vzniku trpasličích kmenů je narušení funkčnosti dýchacího řetězce. Dýchací řetězec je klíčovým místem bakteriálního metabolismu, dochází zde ke konečné fázi katabolismu – regeneraci koenzymů NAD a FAD, generování membránového potenciálu a tvorbě ATP. Pro fungování dýchacího řetězce je klíčový přechod elektronů mezi jednotlivými komplexy zajišťovaný přenašeči elektronů menachinonem (plní u bakterií funkci ubichinonu) a cytochromy. Pro syntézu menachinonu je nezbytný menadion, který si obvykle bakterie dovedou samy vytvořit, v případě SCV kmenů s mutací v genu kódujícím enzym pro syntézu menadionu nebo syntézu některého jeho prekurzoru (thiamin) je pro syntézu menachinonu nutné suplementovat růstové médium menadionem [34]. K obdobné situaci dochází i v případě hemin-auxotrofních SCV, kdy hemin je nezbytným prekurzorem syntézy cytochromů [18].

Narušení dýchacího řetězce u těchto SCV kmenů je vysvětlením pro většinu typických vlastností těchto kmenů. Snížený růst je důsledkem nižší energetické výkonnosti metabolismu bez fungujícího dýchacího řetězce. Také absence pigmentace a snížená produkce toxinů je vysvětlitelná sníženou výkonností energetického metabolismu [8]. Narušená funkčnost dýchacího řetězce má za následek také snížení membránového potenciálu SCV kmenů, a to vede k narušení transportu některých látek, mezi nimi i antibiotik (aminoglykosidů), do bakteriální buňky, které rezultuje v rezistenci k těmto antibiotikům [35].

Hemin- a menadion-auxotrofní SCV kmeny *S. aureus* se mohou vyskytovat při řadě chronických a rekurentních infekcích, byly izolovány od pacientů s abscesy [10], infekční endokarditidou [36], osteomyelitidou [24] a také od pacientů s cystickou fibrózou [13]. Významným faktorem pro je-

jich vznik je léčba aminoglykosidy, zejména gentamicinem [24].

### Thymidin-auxotrofní SCV a cystická fibróza

Dalším druhem auxotrofie u SCV kmenů je závislost na thymidinu, která souvisí s narušením funkce metabolické dráhy syntézy purinových a pyrimidinových bází nezbytných pro syntézu DNA, která je zároveň cílem působení antibiotika – kotrimoxazolu. Narušení této dráhy dává thymidin-auxotrofním SCV kmenům schopnost rezistence k tomuto antibiotiku, a proto dochází při léčbě kotrimoxazolem k selekci těchto rezistentních kmenů. Jako příčina této auxotrofie byla odhalena mutace v genu účastnícím se této metabolické dráhy, a to genu pro thymidylát-syntázu *thyA* [21]. Výskyt thymidin-auxotrofních SCV kmenů byl zdokumentován u pacientů s endokarditidou, při hlubokých abscesech a s nimi související sepsí [14,37], ale nejvíce pozornosti je věnováno jejich výskytu při infekcích dolních cest dýchacích u pacientů s cystickou fibrózou (CF). Frekvence výskytu SCV kmenů u pacientů s CF, vyjádřená jako procentuální podíl počtu pacientů, od nichž byl izolován SCV *S. aureus*, k celkovému počtu pacientů, od nichž byl izolován *S. aureus* (včetně SCV kmenů), kolísá od přibližně 16–20 % [25,38–40] až po 50 % pacientů se stafylokokovou infekcí [13,41] (viz *tabulka 1*). Frekvence výskytu je pravděpodobně v závislosti na míře užívání kotrimoxazolu v jednotlivých centrech pro CF [25]. Thymidin-auxotrofní SCV kmeny tvoří převážnou většinu těchto kmenů, méně často se vyskytují i hemin- a menadion-auxotrofní kmeny nebo kmeny s dvojitou auxotrofií thymidin/hemin [41]. Důležitým faktorem pro vznik SCV kmenů u těchto pacientů je chronická povaha respiračních infekcí a dlouhodobá antibiotická léčba, což jsou důsledky narušené nespecifické imunitní odpovědi dýchacích cest pacientů s CF [42]. Zejména dlouhodobé používání kotrimoxazolu vytváří silný selekční tlak pro vznik thymidin-auxotrofních SCV kmenů [39].

### Hypermutátorové kmeny – souvislost se vznikem SCV

Bakteriální kmeny se označují jako hypermutátorové, pokud vykazují zvýšenou mutační rychlost oproti kontrolnímu vzorku kmenů. Příčinou zvýšeného počtu mutací je naruše-

Tabulka 1  
Frekvence výskytu SCV kmenů mezi pacienty s cystickou fibrózou

Studie	Země	Počet pacientů	Počet pacientů s <i>S. aureus</i>	Počet pacientů s SCV	% SCV/ <i>S. aureus</i>
Gilligan et al., 1987	USA	200	95 (48 %)	20	21 %
Kahl et al., 1998	Německo (Münster)	78	53 (67,9 %)	26	49,10 %
Kahl et al., 2003	Německo (Münster)	72	52 (72,2 %)	24	46,20 %
Besier et al., 2007	Německo (Frankfurt n. M.)	252	120 (48 %)	20	17 %
Schneider et al., 2008	Švýcarsko	98	40 (40,8 %)	8	20 %
Yagci et al., 2011	Turecko	248	123 (49,6 %)	20	16,20 %



ní některého ze systémů zajišťujících opravy poškozené DNA, jednak chyb vznikajících při replikaci a také poškození v důsledku působení chemických či fyzikálních faktorů [43]. U hypermutátorových kmenů je nejčastěji popisováno narušení systému MMR (*methyl-directed mismatch repair system*), konkrétně mutace v genu *mutS* [44]. Hypermutabilita je ve většině situací pro bakterie nevýhodná kvůli zvýšené pravděpodobnosti vzniku letální mutace. Výjimkou jsou případy, kdy je bakteriální populace vystavena silnému selekčnímu tlaku, například při léčbě antibiotiky, v takové situaci mohou být hypermutátorové kmeny ve výhodě. Zvýšený výskyt hypermutátorových kmenů byl popsán u izolátů *S. aureus* od pacientů s cystickou fibrózou [45]. Tyto kmeny mohou reprezentovat významnou část izolátů rezistentních k makrolidovým antibiotikům od těchto pacientů [46]. Jejich výskyt může také souviset s výskytem SCV kmenů, neboť samotné SCV kmeny vykazují zvýšenou mutační rychlost, a to jak oproti NCV kmenům *S. aureus* při cystické fibróze, tak ještě výrazněji oproti kmenům *S. aureus* izolovaných od jiných pacientů [45].

### Intracelulární perzistence

Dalším fenoménem spojeným s významem SCV kmenů pro klinickou praxi je jejich zvýšená schopnost intracelulární perzistence. Právě schopnost fenotypového přechodu *S. aureus* mezi NCV a SCV a zpětná reverze mohou být významnou součástí patogeneze některých stafylokokových infekcí, zejména s chronickým a rekurentním charakterem [47]. Intracelulární perzistence je strategie, která zvyšuje odolnost bakterií jak k antibiotikům, tak k působení řady mechanismů imunitního systému hostitele. Spektrum hostitelských buněk umožňujících *S. aureus* intracelulární existenci je široké, zahrnuje například endotelové a epitelové buňky, keratinocyty, osteoblasty a fibroblasty, ale i profesionální fagocyty – makrofágy a neutrofilny [48]. Zajímavostí je, že některé makrofágy nejenže nedokáží zneškodnit fagocytované bakterie, ale po průniku *S. aureus* do těchto buněk mohou sloužit k diseminaci bakterie v organizmu [49]. U SCV kmenů je významným faktorem zvyšujícím jejich schopnost průniku a perzistence uvnitř eukaryotických buněk zvýšená exprese adhezínů ze skupiny fibronektin vázajících proteinů, což usnadňuje přichycení na povrch hostitelské buňky [32], a také snížená produkce toxinů, zejména alfa toxinu [30].

### Průkaz, testování citlivosti k antibiotikům a léčba infekcí vyvolaných trpasličími kmeny

SCV kmeny představují v klinické praxi problém kvůli jejich obtížné identifikaci a také vzhledem k volbě vhodné léčby infekcí způsobených těmito kmeny. Při identifikaci může dojít k přehlédnutí SCV kmenů, a to kvůli jejich drobnému růstu nebo v důsledku aktivnějšího růstu ostatních izolovaných mikrobů přerůstajících drobné SCV kmeny. Samotná přítomnost SCV kmenů v klinickém vzorku může být obtížně detekovatelná kvůli rapidní reverzi SCV kmenů k divokému fenotypu *in vitro*. Při identifikaci izolovaných SCV kmenů *S. aureus* pomocí biochemických testů může

dojít ke zpoždění některých reakcí v důsledku pomalejší metabolizace řady cukrů (N-acetylglukosamin, trehalóza, sacharóza a další), jiné cukry jako manitol nedokáží SCV kmeny (menadion auxotrofní) využít vůbec. Tento cukr je navíc často součástí médií používaných pro kultivační průkaz stafylokoků, jako je například *Manitol Salt Agar*, což činí tato média pro záchyt SCV kmenů neefektivními [50]. SCV kmeny také vykazují sníženou aktivitu koagulázy a clumping faktoru [14,18], což činí potíže při použití biochemických diagnostických testů.

Pomalý růst SCV kmenů na médiích standardně používaných pro určení citlivosti k antibiotikům (Mueller Hinton médium či krevní Mueller Hinton médium pro hůře rostoucí kmeny) ztěžuje rutinní určení citlivosti či při zcela potlačeném růstu vůbec neumožní citlivost určit. Pokud citlivost určit lze, je otázkou její relevantnost vzhledem k léčbě a k možnosti přítomnosti intracelulárně lokalizovaných bakterií. Například rezistenci k meticilinu (MRSA kmeny) SCV kmenů nelze spolehlivě prokázat běžnými metodami, jako je disková difuzní metoda, mikrodiluční metoda, E-test ani pomocí analyzátoru VITEK 2. Úspěšná je pouze detekce *mecA* genu (determinanta MRSA rezistence) pomocí PCR či detekce proteinu PBP2a (produktu genu *mecA*) pomocí aglutinace, kde je ovšem potřeba podstatně zvýšit množství použité biomasy [51]. Rovněž testování citlivosti thymidin-auxotrofních SCV kmenů ke kotrimoxazolu je obtížné vzhledem k tomu, že přítomnost thymidinu, který tyto kmeny potřebují k růstu, interferuje s testováním citlivosti k tomuto antibiotiku [52].

Otázka léčby infekcí SCV kmeny není jednoduchá. Opatrnost je na místě při použití aminoglykosidů a kotrimoxazolu, zvláště pro dlouhodobější terapii [24,41]. Konkrétní doporučená terapie SCV infekcí dosud neexistuje, někteří autoři doporučují kombinaci antibiotik, z nichž jedním je rifampicin, jakožto antibiotikum s účinkem proti intracelulárním bakteriím. Při monoterapii hrozí u rifampicinu rychlý vznik rezistence. Terapii rifampicinem je proto vhodné doplnit dalším antibiotikem s antistafylokokovým účinkem [15], dobrou účinností i proti SCV kmenům vyazuje například ceftobiprol [53], u SCV MRSA kmenů je lékem volby vankomycin. Při testování účinnosti na tkáňových kulturách byla v eliminaci SCV kmenů velmi efektivní kombinace rifampicinu s kotrimoxazolem [54], nicméně vzhledem k možnosti indukce vzniku thymidin-auxotrofních SCV nemusí být taková léčba zcela vhodná. Účinnost rifampicinu však jiné studie zpochybňují a navrhují nahradit jej nebo užít v kombinaci s novým semisyntetickým antibiotikem oritavancinem. Oritavancin může být také použit v kombinaci s jiným antistafylokokovým antibiotikem [55]. Nadějným se zdá také rostlinný alkaloid tomatidin, který specificky inhibuje růst SCV kmenů i při intracelulární lokalizaci [56].

Další možností terapie je přístup založený na reverzi SCV fenotypu. Terapeutické antibiotikum je doplněno přídatkem auxotrofního požadavku, který brání uplatnění rezistence spojené s SCV fenotypem. U SCV s poruchou dýchacího řetězce dojde k obnovení jeho funkčnosti, a tím k obnovení citlivosti k aminoglykosidům [54]. Tento přístup není ovšem uplatnitelný u thymidin-auxotrofních SCV, kde vztah mezi rezistencí a auxotrofií funguje jiným způsobem.

Vznik SCV kmenů však nemusí být za všech okolností negativním jevem. Jelikož mají tyto kmeny sníženou expresi faktorů virulence a způsobují menší poškození tkáně než rychle rostoucí stafylokoky, někteří autoři uvažují o výhodnosti užití přípravků narušujících funkci dýchacího řetězce, které dokáží rychle inhibovat produkci toxinů a zvrátit průběh akutní infekce [57].

### Závěr

Fenomén SCV kmenů je ukázkou dalšího způsobu, jakým dokáží bakterie odpovědět na vystavení tlaku antibiotické léčby. Tyto kmeny představují výzvu jak pro klinické mikrobiology, pro jejich ztížený průkaz, schopnost odolávat antibiotické léčbě a vyvolat chronické infekce, tak při zkoumání jejich podstaty, jejich vzniku a původu. Výčet možných příčin SCV fenotypu stále narůstá a v budoucnu se jistě dočkáme objevu dalších způsobů, jak tyto fenotypové varianty mohou vznikat. Významné je také spojení těchto kmenů s intracelulární perzistencí a fakt, že i bakterie, u nichž se intracelulární výskyt původně nepředpokládal, mohou při některých infekcích být schopny existence uvnitř hostitelských buněk. Vývoj účinných antibiotik a léčebných postupů, které by umožnily zvládnout tyto infekce, je proto důležitým cílem ve výzkumu SCV kmenů.

### Seznam zkratk

SCV (*Small Colony Variant*) – fenotypová varianta bakterie tvořící nápadně menší kolonie,  
 NCV (*Normal Colony Variant*) – „divoký kmen“ s pro druh typickou velikostí kolonií,  
 MRSA (*Methicillin Resistant S. aureus*) – metilicilin rezistentní *S. aureus*,  
*hemB*, *menB* a *ctaA* – geny pro enzymy syntézy komponent dýchacího řetězce,  
 MsrA, ErmA, B, C a MphC – proteiny rezistence k makrolidovým a linkosamidovým antibiotikům,  
*mecA* – determinanta rezistence k metiliclinu,  
 PBP2 (*Penicillin Binding Protein 2*) – produkt genu *mecA*,  
*thyA* – gen pro thymidylát-syntetázu, účastní se syntézy purinových a pyrimidinových bází  
*relA* – gen složky systému řídicího odpověď bakterie při hladovění na aminokyseliny,  
*rlmN* – gen pro ribozomální metyl-transferázu,  
*sdh* – gen pro sukcinát-dehydrogenázu,  
 SAPIm4 a SAPIm1 (*S. aureus pathogenicity islands*) – mobilní genetické elementy tzv. ostrovy patogenity u *S. aureus*,  
*agr* systém – regulační systém řídicí expresi genů virulence *S. aureus*,  
 RNAIII – efektorová molekula *agr* systému,  
 sigma faktor B – variabilní podjednotka RNA polymerázy určující specifitu k promotorům v tomto případě genů tzv. obecné stresové odpovědi,  
 FnbA a FnbB (*Fibronectin Binding Proteins*) – adheziny,  
 AphC, AphF a Dps – proteiny chránící bakterii při oxidativním stresu, jejich exprese řízena regulátorem PerR,  
 ATP (adenozintrifosfát) – centrální molekula energetického metabolismu buňky,

NAD (nikotinamidadenin dinukleotid) a FAD (flavinadenin dinukleotid) – koenzymy redox reakcí metabolismu,  
 CF – cystická fibróza,  
 MMR (*Methyl-directed Mismatch Repair system*) – systém opravy mutací v DNA,  
*mutS* – gen podílející se na funkci MMR systému.

*Práce byla podpořena grantem MZ IGA NT 12395-5/2011 a MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203.*

### Literatura

- Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in the United States, 2001–2002. *The Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press 2006;197(2):172–179.
- Köck R, Becker K, Cookson B, Van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Burden of Disease and Control Challenges in Europe. *Euro Surveillance: Bulletin Européen sur les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* [Internet]. 2010;15(41):19688.
- Mera RM, Suaya JA, Amrine-Madsen H, Hoge CS, Miller LA, Lu EP, et al. Increasing Role of *Staphylococcus aureus* and Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States: a 10-year Trend of Replacement and Expansion. *Microbial Drug Resistance* Larchmont NY. 2011;17(2):321–328.
- Mandell GL, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: Expert Consult Premium Edition – Enhanced Online Features and Print (Two Volume Set): Gerald L. Mandell: 9780443068393: Amazon.com: Books. 2009.
- Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants in Prosthetic Joint Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;43(8):961–967.
- Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. Respiratory Microbiology of Patients with Cystic Fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*. 2009;136(6):1554–1560.
- Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic Resistance Genes & Susceptibility Patterns in *Staphylococci*. *The Indian Journal of Medical Research*. 2012;135:389–96.
- Proctor RA, Eiff C Von, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small Colony Variants: a Pathogenic Form of Bacteria that Facilitates Persistent and Recurrent Infections. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. 2006;4(4):295–305.
- Sendi P, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* as an Intracellular Pathogen: the Role of Small Colony Variants. *Trends in Microbiology*. 2009;17(2):54–58.
- Kipp F, Ziebuhr W, Becker K, Krimmer V, Höss N, Peters G, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* by 16S rRNA Directed in situ Hybridisation in a Patient with a Brain Abscess Caused by Small Colony Variants. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2003;74:1000–1002.
- Gómez-González C, Acosta J, Villa J, Barrado L, Sanz F, Orellana MA, et al. Clinical and Molecular Characteristics of Infections with CO<sub>2</sub>-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(8):2878–2884.
- Kahl BC, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G. Thymidine-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Exhibit Gross Morphological and Ultrastructural Changes Consistent with Impaired Cell Separation. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(1):410–413.
- Kahl BC, Herrmann M, Schulze-Everding A, Koch HG, Becker K, Harms E, et al. Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998;177(4):1023–1029.
- Seifert H, Eiff C Von, Fätkenheuer G. Fatal Case Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants in an AIDS Patient. *Emerging Infectious Diseases*. 1999;5(3):450–453.
- Eiff C Von. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants: a Challenge to Microbiologists and Clinicians. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008;31(6):507–510.
- Kriegeskorte A, König S, Sander G, Pirkil A, Mahabir E, Proctor RA, et al. Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Reveal Distinct Protein Profiles. *Proteomics*. 2011;11(12):2476–2490.
- Gao W, Chua K, Davies JK, Newton HJ, Seemann T, Harrison PF, et al. Two Novel Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Reduce Linezolid Susceptibility and Switch on the String Response to Promote Persistent Infection. *PLoS Pathogens*. 2010;6(6):e1000944.

18. Eiff C Von, Heilmann C, Proctor RA, Woltz C, Peters G, Götz F. A Site-Directed Staphylococcus aureus hemB Mutant Is a Small-Colony Variant Which Persists Intracellularly. *Journal of Bacteriology*. 1997;179(15):4706–4712.
19. Lannergård J, Eiff C Von, Sander G, Cordes T, Seggewiss J, Peters G, et al. Identification of the Genetic Basis for Clinical Menadione-Auxotrophic Small-Colony Variant Isolates of Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(11):4017–4022.
20. Clements MO, Watson SP, Poole RK, Foster SJ. CtaA of Staphylococcus aureus Is Required for Starvation Survival, Recovery, and Cytochrome Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(2):501–507.
21. Chatterjee I, Kriegeskorte A, Fischer A, Deiwick S, Theimann N, Proctor RA, et al. In vivo Mutations of Thymidylate Synthase (Encoded by thyA) Are Responsible for Thymidine Dependency in Clinical Small-Colony Variants of Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*. 2008;190(3):834–842.
22. Gaupp R, Schlag S, Liebeke M, Lalk M, Götz F. Advantage of Upregulation of Succinate Dehydrogenase in Staphylococcus aureus Biofilms. *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM). 2010;192(9):2385–2394.
23. Cui L, Neoh H, Iwamoto A, Hiramatsu K. Coordinated Phenotype Switching with Large-Scale Chromosome Flip-Flop Inversion Observed in Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(25):E1647–1656.
24. Eiff C Von, Bettin D, Proctor RA, Rolauffs B, Lindner N, Winkelmann W, et al. Prevalence of Small Colony Variants of Staphylococcus aureus Following Gentamicin Bead Placement for Osteomyelitis. *Clinical Infectious Diseases*. 1997; 25:1250–1251.
25. Besier S, Smaczny C, Von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, et al. Prevalence and Clinical Significance of Staphylococcus aureus Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Lung Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45(1):168–172.
26. Musher DM, Baughn RE, Templeton GB, Minuth JN. Emergence of Variant Forms of Staphylococcus aureus after Exposure to Gentamicin and Infectivity of the Variants in Experimental Animals. *Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press; 1977;136(3):360–369.
27. Biswas L, Biswas R, Schlag M, Bertram R, Götz F. Small-Colony Variant Selection as a Survival Strategy for Staphylococcus aureus in the Presence of Pseudomonas aeruginosa. Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology (ASM). 2009;75(21):6910–6912.
28. Mitchell G, Séguin DL, Asselin A-E, Déziel E, Cantin AM, Frost EH, et al. Staphylococcus aureus Sigma B-Dependent Emergence of Small-Colony Variants and Biofilm Production Following Exposure to Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiology Bio Med Central*. 2010; 10(33).
29. Besier S, Ludwig A, Ohlsen K, Brade V, Wichelhaus TA. Molecular Analysis of the Thymidine-Auxotrophic Small Colony Variant Phenotype of Staphylococcus aureus. *IJMM*. 2007;297(4):217–225.
30. Tuchscherer L, Medina E, Hussain M, Völker W, Heitmann V, Niemann S, et al. Staphylococcus aureus Phenotype Switching: an Effective Bacterial Strategy to Escape Host Immune Response and Establish a Chronic Infection. *EMBO Molecular Medicine*. 2011;3(3):129–141.
31. Moisan H, Brouillette E, Jacob CL, Langlois-Bégin P, Michaud S, Malouin F. Transcription of Virulence Factors in Staphylococcus aureus Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients Is Influenced by SigB. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(1):64–76.
32. Mitchell G, Lamontagne C-A, Brouillette E, Grondin G, Talbot BG, Grandbois M, et al. Staphylococcus aureus SigB Activity Promotes a Strong Fibronectin-Bacterium Interaction Which May Sustain Host Tissue Colonization by Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Molecular Microbiology*. 2008;70(6):1540–1555.
33. Seggewiss J, Becker K, Kotte O, Eisenacher M, Yazdi MRK, Fischer A, et al. Reporter Metabolite Analysis of Transcriptional Profiles of a Staphylococcus aureus Strain with Normal Phenotype and its Isogenic hemB Mutant Displaying the Small-Colony-Variant Phenotype. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(22): 7765–7777.
34. Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of Vitamin K (Menaquinone ) in Bacteria. *Microb and Molec Biol Rev*. 1982;46(3):241–280.
35. Baumert N, Eiff C Von, Schaaff F, Peters G, Proctor RA, Sahl H-G. Physiology and Antibiotic Susceptibility of Staphylococcus aureus Small Colony Variants. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*. Mary Ann Liebert, Inc.; 2002;8(4):253–260.
36. Bhattacharyya S, Roy S, Mukhopadhyay P, Rit K, Dey J, Ganguly U, et al. Small Colony Variants of Staphylococcus aureus Isolated from a Patient with Infective Endocarditis: a Case Report and Review of the Literature. *Iranian Journal of Microbiology*. 2012;4(2):98–99.
37. Maduka-Ezeh A, Seville MT, Kusne S, Vikram HR, Blair JE, Greenwood-Quaintance K, et al. Thymidine Auxotrophic Staphylococcus aureus Small-Colony Variant Endocarditis and Left Ventricular Assist Device Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(3):1102–1105.
38. Yagci S, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U, Sener B. Prevalence and Genetic Diversity of Staphylococcus aureus Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Patients. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;19(1):77–84.
39. Gilligan PH, Gage PA, Welch DF, Muszynski MJ, Wait KR. Prevalence of Thymidine-Dependent Staphylococcus aureus in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1987;25(7):1258–1261.
40. Schneider M, Mühlemann K, Droz S, Couzinet S, Casaulta C, Zimmerli S. Clinical Characteristics Associated with Isolation of Small-Colony Variants of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(5): 1832–1834.
41. Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, et al. Population Dynamics of Persistent Staphylococcus aureus Isolated from the Airways of Cystic Fibrosis Patients during a 6-Year Prospective Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(9):4424–4427.
42. Döring G, Gulbins E. Cystic Fibrosis and Innate Immunity: How Chloride Channel Mutations Provoke Lung Disease. *Cellular Microbiology*. 2009;11(2):208–216.
43. Jolivet-Gougeon A, Kovacs B, Le Gall-David S, Le Bars H, Bousarghin L, Bonnaure-Mallet M, et al. Bacterial Hypermutation: Clinical Implications. *Journal of Medical Microbiology*. 2011;60(Pt 5):563–573.
44. Oliver A, Baquero F, Blázquez J. The Mismatch Repair System (mutS, mutL and uvrD Genes) in Pseudomonas aeruginosa: Molecular Characterization of Naturally Occurring Mutants. *Molecular Microbiology*. 2002;43(6):1641–1650.
45. Besier S, Zander J, Kahl BC, Kraiczky P, Brade V, Wichelhaus TA. The Thymidine-Dependent Small-Colony-Variant Phenotype is Associated with Hypermutability and Antibiotic Resistance in Clinical Staphylococcus aureus Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(6):2183–2189.
46. Prunier AL, Malbrun B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R. High Rate of Macrolide Resistance in Staphylococcus aureus Strains from Patients with Cystic Fibrosis Reveals High Proportions of Hypermutable Strains. *The Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press. 2003;187(11):1709–1716.
47. Garzoni C, Kelley WL. Return of the Trojan Horse: Intracellular Phenotype Switching and Immune Evasion by Staphylococcus aureus. *EMBO Molecular Medicine*. 2011;3(3):115–117.
48. Garzoni C, Kelley WL. Staphylococcus aureus: New Evidence for Intracellular Persistence. *Trends in Microbiology*. 2009;17(2):59–65.
49. Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, et al. A Potential New Pathway for Staphylococcus aureus Dissemination: the Silent Survival of S. aureus Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS One*. 2008;3(1):e1409.
50. Eiff C Von, Mcnamara P, Becker K, Bates D, Lei X, Ziman M, et al. Phenotype Microarray Profiling of Staphylococcus aureus menD and hemB Mutants with the Small-Colony-Variant Phenotype. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(2):687–693.
51. Kipp F, Becker K, Peters G, Von C, Eiff C Von. Evaluation of Different Methods to Detect Methicillin Resistance in Small-Colony Variants of Staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(3):1277–1279.
52. Ferguson RW, Weissfeld S. Comparison of the Suitability of Three Common Bacterial Media for Susceptibility Testing of Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Journal of Clinical Microbiology*. 1984;19(1):85–86.
53. Eiff C Von, Friedrich AW, Becker K, Peters G. Comparative in vitro Activity of Ceftobiprole against Staphylococci Displaying Normal and Small-Colony Variant Phenotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(10):4372–4374.
54. Proctor RA, Peters G. Small Colony Variants in Staphylococcal Infections: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clinical Infectious Diseases*. 1998;27:419–422.
55. Nguyen HA, Denis O, Vergison A, Theunis A, Tulkens PM, Struelens MJ, et al. Intracellular Activity of Antibiotics in a Model of Human THP-1 Macrophages Infected by a Staphylococcus aureus Small-Colony Variant Strain Isolated from a Cystic Fibrosis Patient: Study of Antibiotic Combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(4):1434–1442.
56. Mitchell G, Gattuso M, Grondin G, Marsault É, Bouarab K, Malouin F. Tomatidine Inhibits Replication of Staphylococcus aureus Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(5):1937–1945.
57. Proctor RA, Dalal SC, Kahl BC, Brar D, Peters G, Nichols W. Two Diarylurea Electron Transport Inhibitors Reduce Staphylococcus aureus Hemolytic Activity and Protect Cultured Endothelial Cells from Lysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(8):2333–2336.



# Cytomegalovirus a jeho vztah k chronickým zánětům střev a nádorovým onemocněním

M. FAJFR<sup>1,2</sup>, V. ŠTĚPÁNOVÁ<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany Hradec Králové, Katedra epidemiologie, <sup>2</sup>Ústav klinické mikrobiologie, FN a LF UK Hradec Králové, <sup>3</sup>Národní referenční laboratoř pro cytomegalovirus

## SOUHRN

Fajfr M., Štěpánová V.: **Cytomegalovirus a jeho vztah k chronickým zánětům střev a nádorovým onemocněním**

Lidský cytomegalovirus (hCMV), člen podčeledi *Betaherpesvirinae*, byl po léta pokládán za významný patogen zejména při oslabení imunitního systému hostitele, zejména pak při imunosupresivní terapii u pacientů po transplantaci. Podle závěrů řady studií z posledního desetiletí se zdá, že je cytomegalovirus velmi významným patogenem s daleko širší souvislostí s ostatními chorobami. Dlouho sledovaný je vztah hCMV k chronickým zánětům střev, ulcerózní kolitidě a Crohnově chorobě, ale výsledky studií doposud nebyly schopny tento vztah přesně definovat. Za zajímavé lze jistě označit výrazně vyšší záchyt hCMV v lézích u těžkých kolitid, a zejména pak refrakterních na kortikoterapii (dle závěrů z klinických studií ve 40–57 %), v porovnání s nízkým záchytem u lehkých a středně těžkých kolitid (ve většině studií pod 5 %). Druhou skupinou chorob sledovanou pro možný vztah k hCMV jsou některé nádorové choroby. V řadě studií je diskutována onkomodulační schopnost hCMV viru u maligního glioblastomu, kolorektálních karcinomů, nádorů prostaty a lymfomů. I přes řadu důkazů podporujících možný vztah, například při úspěšném vyvolání nádorového onemocnění CMV na zvířecích modelech, se stále ještě hCMV nepovažuje za prokázaný onkovirus, i když jeho potenciál v této záležitosti je zřejmý.

*Klíčová slova:* hCMV, cytomegalovirus, chronické záněty střev, nádorová onemocnění

## SUMMARY

Fajfr M., Štěpánová V.: **Cytomegalovirus and its relationship to chronic inflammatory bowel diseases and tumors**

Human cytomegalovirus (hCMV), a member of the *Betaherpesvirinae* subfamily, was long considered an important pathogen especially in immunocompromised hosts, mainly in post-transplant patients receiving immunosuppressive therapy. Results of many studies from the last decade suggest that cytomegalovirus is a very important pathogen having a greater association with many other diseases. The relationship of hCMV to chronic inflammatory bowel diseases, ulcerative colitis and Crohn's disease, has been long studied but results of the studies have been rather inconclusive. Interestingly, hCMV was found to be more prevalent in lesions of severe ulcerative colitis, in particular ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapy (40–57% in results from clinical studies) than in mild or moderate colitis (up to 5% in most studies). Another group of diseases possibly related to hCMV is tumors. Numerous studies discuss the oncomodulatory role of hCMV in malignant glioblastoma, colorectal adenocarcinomas, prostate cancer and lymphomas. Despite extensive evidence suggesting a possible relationship of hCMV to some tumors, such as successful induction of malignant carcinoma by hCMV latent infection in animal models, hCMV has not been classified as an oncovirus. However, its potential in this respect is apparent.

*Keywords:* Human cytomegalovirus (hCMV), cytomegalovirus, chronic inflammatory bowel diseases, tumors

*Klin mikrobiol inf lék 2013;19(3):103–106*

**Adresa:** MUDr. Miroslav Fajfr, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany Hradec Králové, Katedra epidemiologie, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, e-mail: fajfrmiroslav@seznam.cz

Došlo do redakce: 28. 1. 2013

Přijato k tisku: 23. 8. 2013

## Úvod

Lidský cytomegalovirus (hCMV, HHV5) patří mezi středně velké obalené viry s dvojlávkem DNA čeledi *Herpesviridae*. Tato čeleď je podle rozdílů v genomech i ve vlastnostech dělena do celkem tří podčeledí. hCMV je spolu s HHV6 a HHV7 řazen do podčeledi *Betaherpesvirinae*, která vyniká poměrně dlouhou generační dobou. Cytomegalovirus má z herpesvirů nejrozsáhlejší genom, kolem 240 kbp, který je strukturou velmi blízký genomu HHV1, včetně unikátních opakujících se úseků, jen je o cca 60 % větší.

Takto velký genom obsahuje celkem 252 kódujících oblastí (tzv. „open reading frames“), které mohou teoreticky kóduvat stejný počet proteinů.

Podle dostupných údajů se však na vlastní replikaci viru podílí maximálně 45 až 57 genů a o funkci ostatních kódujících oblastí toho není stále ještě mnoho známo [1]. Betaherpesviry obecně způsobují obvykle subklinické nebo inaparentní infekce a velká většina populace získá infekci v raném dětském věku. Infekce cytomegalovirem přechází, jak je ostatně u herpesvirů běžné, po primoinfekci a nabu-



zení imunitní odpovědi nakaženého jedince do stavu persistence až latence zejména v progenitorových buňkách myeloidní řady a endoteliálních buňkách, a je tedy možná jejich reaktivace při oslabení obranyschopnosti jedince. Život ohrožující a orgány ohrožující infekce se objevují pouze u imunokompromitovaných jedinců, například u pacientů po transplantacích orgánů s imunosupresivní terapií. Nicméně se v poslední době začínají množit údaje o možném vztahu dlouhodobé infekce hCMV k řadě chronických infekcí, od aterosklerózy až po chronické onemocnění střev. Navíc je řadou autorů diskutována i souvislost latentní infekce hCMV s některými typy nádorových onemocnění. Opodstatněnost těchto úvah dokládá i mezinárodní workshop, který proběhl v USA v roce 2011 a který se zabýval vztahem hCMV a maligního glioblastomu, resp. otázkou, zda lze hCMV zařadit k prokázaným onkovirům. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli shrnout nové poznatky o aktuálních vztazích hCMV k uvedeným dvěma skupinám chorob – chronickým zánětlivým chorobám a nádorovým onemocněním.

### Chronické záněty a CMV

hCMV infekce má u imunokompromitovaných jedinců několik hlavních klinických manifestací. Mezi ty nejčastější patří CMV retinitida (častá u pacientů s AIDS), CMV atypická pneumonie (častá u pacientů s transplantovaným orgánem a imunosupresivní terapií) a konečně hCMV kolitida (častá u obou skupin) [1]. Právě pro schopnost vytvářet obraz zánětlivého onemocnění tlustého střeva se začalo uvažovat o možném vztahu hCMV k chronickým zánětlivým onemocněním střev (IBD – inflammatory bowel disease) – ulcerózní kolitidě (UC) a Crohnově chorobě (CD). Přítomnost hCMV v zánětlivých ložiscích jistě souvisí s aktivací prozánětlivých cytokinů, jako TNF-alfa a interferonu gama, což aktivuje myeloidní řadu včetně buněk s latentní infekcí hCMV. Tyto aktivované buňky vyvrávají v makrofágy, které jsou poté chemotakticky vychytávány v ložiscích zánětu (například v ložiscích zánětu při UC nebo CD), ale následná reaktivace hCMV v těchto ložiscích má již ne zcela jisté důsledky [2]. Od prvního publikovaného pozorování inkluze CMV v ložisku UC uplynulo již téměř 50 let a od té doby si odborníci po celém světě kladou otázku, zda se jedná o pouhou přítomnost hCMV v ložisku nebo zda se jedná o kauzální vztah mezi těmito nálezy, resp. zda hCMV „pouze“ zhoršuje prognózu zánětlivé choroby střev nebo zda ji způsobuje [3].

Velkým problémem v zodpovězení těchto otázek je vlastní diagnostika. Sérologie je metoda zcela nevhodná pro diagnostiku hCMV infekce střev, neboť značná část populace (35–80 % podle věku) je séropozitivní ve třídě IgG, a není tedy možno přesněji predikovat stav infekce ve vztahu k nálezům IgG protilátek [4]. Metoda detekce antigenu pp65 v leukocytech krevního řečiště je metodou vysoce senzitivní a specifickou a doporučovanou pro monitoring hCMV infekce např. u pacientů po transplantacích, nicméně pro diagnostiku hCMV chorob střev se neukázala jako vhodná. Podle některých autorů je nález a hodnoty pozitivní antigenemie u pacientů s IBD výrazně nižší než u infekcí hCMV v jiných lokalizacích [5,6]. Jako nejvhodnější metoda v diagnostice hCMV infekcí bývá považována kvantitativní PCR, která má nicméně v diagnostice hCMV u pacientů s IBD řadu limitací. Při diagnostice virémie nebyla doposud proká-

zána jasná korelace mezi nálezem CMV v krvi a nálezem CMV ve sliznici střeva, a proto je hodnocení vztahu nálezů hCMV v krvi k IBD problematické. Proto se některé výzkumné skupiny pokoušely stanovit klinicky významnou vztahovou nálož v postižené intestinální tkáni, která by predikovala horší odpověď na léčbu UC (zejména rezistenci na kortikoterapii), jako významná nálož byla podle autorů stanovena hranice 250 kopií na 1 mg tkáně [7]. Výhodou PCR je možnost detekce viru (resp. jeho geonomu) přímo ze vzorků sliznice postiženého střeva, ale bez průkazu zánětu je stanovení závěru obtížné [4]. Jako nejvhodnější se tedy zdá být metoda imunohistochemická (IHC), která dává možnost vyhodnotit histologický nález ze vzorku (zda je přítomen zánět a jaký) a zároveň provést i detekci hCMV pomocí značené protilátky [4]. Podle doporučení diagnostiky hCMV u IBD publikované v European Crohn's and Colitis Organisation guidelines z roku 2009 jsou jako nejvhodnější metody uznány PCR a metoda IHC z bioptických vzorků [8].

Současně s PCR je nutná i diagnostika kolonoskopická s možností vizualizace tíže zánětlivých změn. Podle studie japonských autorů je rozsah lézí spolu s PCR nálezem hCMV z místa postižení predikčním faktorem dalšího vývoje. Nález velkých vředů vykazoval statisticky významnější průběh končící parciálními kolektomiemi než u lehčích nálezů, které takto končily zřídka [9]. Podobné závěry jsou zřejmé z přehledové práce Lawora a Mosse, kteří udávají nález hCMV metodou PCR ze vzorků tkáně u pacientů s CD pod 5 %, a to i přes vysoké procento pacientů se séropozitivitou ve třídě IgG. Shodné výsledky jsou také udávány u pacientů s lehkou formou nebo inaktivní formou UC, kdy se podle autorů metodou PCR ani IHC nepodařilo hCMV ve vzorcích tkání prokázat nebo byly zjištěny pouze ve velmi nízkém počtu do 2 % [4,10]. Zcela jiná situace je u pacientů s těžkou formou UC a/nebo UC refrakterní na kortikoterapii. V této skupině nemocných se podle různých studií podařilo hCMV prokázat ze vzorků biopsií metodou IHC v 25–36 % a metodou PCR pak v 40–57 % [4]. Z těchto údajů vyplývá, že hCMV má možný kauzální vztah k těžkým formám UC.

Nicméně jak prokazují mnozí autoři, objevuje se hCMV ve vzorcích tkání až po 7–10denní imunosupresivní terapii, a velmi pravděpodobně se tedy jedná o reaktivaci latentní CMV infekce, která poté ale statisticky významně zhoršuje průběh UC a častěji vede k vynuceným kolektomiím. Zdá se, že zatímco terapie kortikoidy (prednison) a některými imunosupresivy (jako cyklosporin A) mají efekt podporující reaktivaci latentní infekce, tak terapie UC jinými imunosupresivy (azathioprin) tento efekt nemají. Velmi pravděpodobně tento fenomén souvisí s mírou suprese CMV-specifických T-lymfocytů, které jsou stěžejní pro eliminaci viru [4,11,12]. Jiní autoři však poukazují na nález autoimunitních cytotoxických protilátek anti-CD13, které se u pacientů s pozitivním nálezem hCMV (virus aktivně využívá CD13 protein, čili aminopeptidázu N, v rámci replikačního cyklu jako receptorovou molekulu pro vstup do buněk) a UC nebo CD nacházejí ve vysokém procentu (58–66 %) a nevyskytují se v kontrolních skupinách pacientů. Tyto autoprottilátky by mohly být přímým činitelem, který se spolupodílí na vzniku či zhoršení vlastní IBD [13,14]. Myšlenku možné etiopatogeneze dokládá i publikace zabývající se interakcí CMV a uměle vyvolané kolitidy u zvířecího modelu (laboratorní myš a hybridní myš IL-10<sup>-/-</sup>, která nemá schopnost

vytvářet IL-10 a je vysoce senzitivní pro vyvolání zánětu). V této práci bylo prokázáno, že pro zhoršení průběhu kolitidy není nutná replikace viru, sama latentní infekce postčuje k negativnímu ovlivnění. Jak se autoři domnívají, pravděpodobně na podkladě snížené slizniční obranyschopnosti vyvolané latentní infekcí a produkcí latentních virových proteinů [15].

Stále tedy existuje, i přes velkou snahu o objasnění vztahu hCMV k IBD, více otázek nezodpovězených než těch zodpovězených. Stejně se rozcházejí i názory na terapeutický zásah proti nálezu hCMV u pacientů s UC nebo CD, resp. na klinický benefit této léčby. Podle některých autorů by měl být podán ganciklovir, zejména u UC refrakterních ke kortikoterapii, protože se výrazně sníží procento nutných resekcí nebo se obnoví odpověď na kortikoterapii [12,16,17]. Jiní autoři ale poukazují na vymizení hCMV ze vzorků u řady pacientů s IBD i bez nutnosti podání antivirové terapie, a poukazují tak na nutnost dalšího výzkumu a stanovení jasných kritérií pro zvážení podání specifických antivirotik [5,18]. Jako úplně nový přístup ve vztahu hCMV a UC refrakterní ke kortikoterapii je terapie pomocí selektivní granulocyto-monocytární adsorpční aferézy. Podle autorů studie prokazatelně zlepšila jak prognózu (výrazně nižší procento nutných kolektomií, 18 % oproti 56 %), tak i eliminaci, resp. remisi hCMV infekce v oblasti gastrointestinálního traktu v porovnání se standardní terapií s podáváním antivirotik a imunomodulátorů [19].

### Nádorové onemocnění a CMV

Podobně jako u vztahu hCMV k ulcerózní kolitidě, tak i vztahu tohoto viru k některým nádorovým onemocněním si povšimli někteří vědci před poměrně dlouhou dobou. Časté nálezy hCMV v ložiscích adenokarcinomů tlustého střeva byly poprvé publikovány již v roce 1978 a od té doby se podařilo prokázat výskyt hCMV i u řady jiných nádorových onemocnění, jako karcinomů prostaty, karcinomů ovárií, karcinomů cervixu, lymfomů, astrocytomů a glioblastomů [20,21]. Nicméně stejně jak tomu je u chronických zánětlivých chorob, i zde si postupně začali autoři uvědomovat, že prostá přítomnost viru v ložisku nádoru nemusí nutně znamenat jeho kauzální vztah k danému onemocnění, a to i vzhledem k obtížnému hodnocení nálezů jednotlivých diagnostických metod.

Z celé skupiny nádorových onemocnění je o etiologickém vztahu hCMV uvažováno víceméně pouze u dvou typů onemocnění, a to intestinálních adenokarcinomů a nádorů mozku. Velká pozornost byla věnována zejména vztahu hCMV k nádorům tlustého střeva, a to kolorektálnímu karcinomu. Jedna z hypotéz vycházela z nálezů hCMV u chronických zánětlivých onemocnění střev, zejména ulcerózní kolitidy, které v některých případech vedou ke vzniku adenokarcinomů. V tomto typu nádorového onemocnění bývá cytomegalovirus pravidelně nacházen, i když daleko méně než třeba u ulcerózní kolitidy (14,3 % oproti 57,1 %) [22–24]. Někteří autoři dokonce ve svých pozorováních tyto nálezy nepotvrdili vůbec nebo prokázali přítomnost jiného herpesviru – viru Epsteinova a Barrové [20,25,26]. Řada autorů si povšimla vyšší incidence kolorektálních karcinomů u specifické skupiny pacientů po renální transplantaci [27]. Vzhledem k imunosupresivní terapii u těchto pacientů jsou herpesviry, a hCMV zejména, poměrně často diagnostikovány. Udává se, že 50–90 % pacientů po transplantaci kostní dřeně nebo

solidního orgánu prodělá reaktivaci hCMV infekce [21]. Proto nepřekvapí závěry, které poukazují na vyšší výskyt záchtů těchto virů u kolorektálních adenokarcinomů u transplantovaných pacientů [26,28]. Na druhou stranu existuje i několik prací, které poukazují na častější nálezy řady jiných patogenů, včetně bakterií a parazitů. Podle autorů těchto prací by mohly různé patogeny působit intestinální dysmikrobiu, která se poté přes různé regulační mechanismy spolupodílí na vzniku adenokarcinomů [21,29,30]. Ale pouze u hCMV se podařilo prokázat možný vztah k intestinálním karcinomům na zvířecím modelu. Bonders a kol. prokázali na modelu transgenní myši linie VS28 podpůrný efekt některých hCMV virových proteinů při tvorbě intestinálních neoplázií a karcinomů [31]. I přes všechna tato pozorování se většina autorů kloní spíše k názoru, že hCMV nemá příčinný vztah k rozvoji intestinálních adenokarcinomů, i když některé virové proteiny mohou být zodpovědné za zhoršení jejich průběhu [20,21].

Druhou velkou skupinou nádorových onemocnění, která se zkoumají ve vztahu k hCMV, jsou některé nádory mozku a jeho obalů. Interakce mezi virem a mozkovou tkání vychází z pozorování, že hCMV má afinitu k progenitorovým buňkám v oblasti subventrikulární zóny, která slouží jako centrum pro tvorbu lokálních progenitorových buněk bílé řady. Podle pozorování využívá hCMV tyto buňky jako hlavní cíl zejména při kongenitálních infekcích [32]. Nejvíce sledované z těchto nádorových onemocnění jsou gliomy, nejvíce pak glioblastoma multiforme a astrocytom grade IV, které patří mezi nejagresivnější nádory s velmi špatnou prognózou, u nichž bývají hCMV genomové sekvence a proteiny pravidelně nacházeny [32,33]. U těchto pacientů pak bývá pravidelně nalézána také hCMV virémie (ve více jak 80 %), která poukazuje na systémovou reaktivaci tohoto viru u těchto agresivních typů nádorů. Navíc se zdá, že čím vyšší je virová nálož, tím je i horší prognóza pacientů – délka přežití pacientů s nízkou virovou náloží je více než dvojnásobná oproti těm s náloží vysokou [32]. Velice zajímavé bylo i zjištění, že některé úseky genomu hCMV a jejich produkty se našly pouze v napadené nádorové tkáni, zatímco v tkáni zdravé detekovány nebyly, resp. se našly v daleko menším procentu [33,34].

Pravdou však zůstává to, že žádná studie zatím neprokázala přímý karcinogenní (transformační) efekt hCMV na lidské buňky, a z tohoto důvodu se většina autorů kloní k názoru, že tento virus není onkogenem. Prokázáný je však tzv. onkomodulační efekt latentní infekce hCMV na řadu humánních buněk. Onkomodulační efekt spočívá ve schopnosti cytomegaloviru, resp. jeho virových proteinů, modifikovat biologii nádorových buněk, a tím tak přispět k dalšímu rozvoji zhoubného bujení. Tyto virové proteiny tak působí na metabolické či informační buněčné kanály, transkripční cesty, apoptózu apod. Onkomodulační působky se mohou, jak se zdá, manifestovat pouze v nádorových buňkách, zatímco ve zdravých buňkách se jejich efekt neprojevuje [21,35]. Tato schopnost hCMV byla potvrzena při testování na nádorových a nenádorových tkáňových kulturách, kde byl tento rozdíl v účinnosti virových působků objeven [36,37]. Dalším důkazem je průkaz některých virových proteinů pouze u vysoce invazivních typů nádorů, zatímco u neagresivních forem tyto virové proteiny nebývají detekovány [38]. Cytomegalovirus má schopnost zvyšovat invazivitu nádorových buněk ulehčením celulární migrace těchto postižených buněk, což způsobuje deregulace exprese některých

adhesivních buněčných molekul jako VLA-5 integrin  $\alpha 1\beta 5$ , nebo ICAM-1, CD11b a CD65 [21]. Dalším onkomodulačním mechanismem, kterým hCMV podporuje zhoubné bujení, je inhibice apoptózy, čímž jsou nádorové buňky výrazně odolnější i například proti chemickým látkám (chemoterapie), ale daleko méně již proti radiaci (radioterapie). Nejméně 4 virové proteiny plní v infikovaných buňkách úlohu inhibitorů apoptózy, jsou to časné proteiny IE1, IE2 a virové proteiny UL 36, UL 37 [32,39]. Další z virových proteinů US 28 (chemokinový receptor) má řadu vlastností, kterými podporuje invazivitu bujení. Mezi nejzajímavější patří efekt podporující neoangiogenezi, která byla prokázána na tkáňových kulturách nádorových gliomových buněk. Za zmínku jistě stojí, že glioblastomy se schopností neoangiogeneze patří k těm nejagresivnějším typům tohoto onemocnění [38]. Schopnost interakce proteinu US 28 s buněčným cyklem ve smyslu jeho proliferace cestou deregulace buněčných regulačních metod byla úspěšně prokázána při pokusech na transgenických myších [31].

Z předchozích rádků vyplývá, že hCMV má pravděpodobně důležitý vliv v onkogenezi jednotlivých nádorů a zhoršuje jejich průběh a prognózu pacientů. Proto si řada autorů položila otázku, zda je možno těmto interakcím zamezit pomocí aplikace antivirotik. Při pokusech na myších byl prokázán pozitivní efekt valgancikloviru na buňky medulloblastomu (gliom zejména dětské populace), kdy došlo k inhibici růstu nádoru, a to zejména při kombinaci antivirotika s COX-2 inhibitorem celecoxibem. Inhibice růstu nádorových buněk v pokusu korespondovala s redukcí exprese některých pozdních latentních virových proteinů, což by mohlo svědčit o terapeutickém efektu valgancikloviru v důsledku zábrany produkce těchto proteinů [40]. Tyto výsledky a výsledky některých dalších studií, které poukázaly na vyšší medián přežití u pacientů s glioblastomem léčených antivirovým preparátem s NSAID (20,6 měsíců oproti 15,4), naznačují důležitý vliv hCMV infekce u tohoto typu nádoru i možné budoucí rozšíření jeho léčby i o přelčení hCMV infekce [40].

## Závěr

Přehledový článek velmi stručně shrnuje recentní poznatky o relativně nové kapitole patogenity cytomegaloviru. Jedná se o problematiku, která je i přes intenzivní zkoumání stále velmi nejednoznačná. Některé závěry studií jak ve vztahu k intestinálním chronickým zánětům, tak i nádorovým onemocněním jsou velmi zajímavé. Odborníci se nicméně shodli na onkomodulační roli cytomegaloviru u glioblastomů a na potřebě pečlivého sledování vztahu hCMV k nádorovým onemocněním obecně [41].

## Literatura

- Britt WJ. *Betaherpesviruses: cytomegalovirus, human herpesviruses 6 and 7 in Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections*, 10. edice. London. HodderArnold Publishers. 2005, 520–527.
- Söderberg-Naucler C. Human cytomegalovirus persists in its host and attacks and avoids elimination by the immune systems. *Critical Reviews in Immunology*. 2006;26(3):231–263.
- Powell RD, Wamer NE, Levine RS, et al. Cytomegalic inclusion disease and ulcerative colitis: report of a case in young adult. *Am J Med*. 1961;30:334–340.
- Lawor G, Moss AC. Cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: pathogen or innocent bystander? *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(9):1620–1627.
- Matsuoka K, Iwao Y, Mori T, et al. Cytomegalovirus is frequently reactivated and disappears without antiviral agents in ulcerative colitis patients. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:331–337.
- Kambham N, Vij R, Cartwright CA, Longacre T. Cytomegalovirus infection in steroid-refractory ulcerative colitis: a case-control study. *Am J Surg Pathol*. 2004;46:S59–S65.

- Roblin X, Pillet S, Oussalah A, et al. Cytomegalovirus load in inflamed intestinal tissue is predictive of resistance to immunosuppressive therapy in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(11):2001–2008.
- Rahier JF, Ben-Horin S, Chowers Y, et al. European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis*. 2009;3:47–91.
- Omiya M, Matsushita M, Tanaka T, et al. The absence of large ulcer predicts latent cytomegalovirus infection in ulcerative colitis with positive mucosal viral assay. *Inter Med*. 2010;49(21):2277–2282.
- Yamamoto-Furusho JK, deLeón-Rendón JL, Rodas L. Infection frequency in patients with chronic idiopathic ulcerative colitis. *Rev Gastroenterol Mex*. 2012;77(4):186–192 [Abstract].
- Domenech E, Vega R, Ojanguren I, et al. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis: a prospective comparative study on prevalence and diagnostic strategy. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(10):1373–1379.
- Nguyen M, Bradford K, Zhang X et Shih DQ. Cytomegalovirus reactivation in ulcerative colitis patients. *Ulcers*. 2011;1–11.
- Rahbar A, Boström L, Söderberg-Naucler C. Detection of cytotoxic CD 13-specific autoantibodies in sera from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Autoimmun*. 2006;26(3):155–164.
- Söderberg C, Sumitran-Karuppan S, Ljungman P, Moller E. CD 13-specific autoimmunity in cytomegalovirus-infected immunocompromised patients. *Transplantation*. 1996;61(4):594–600.
- Onyegocha C, Hossain MS, Kumar A, et al. Latent cytomegalovirus infection exacerbates experimental colitis. *Am J Pathol*. 2009;175(5):2034–2042.
- Kim YS, Kim YH, Kim JS, et al. The prevalence and efficacy of ganciclovir on steroid-refractory ulcerative colitis with cytomegalovirus infection: a prospective multicenter study. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(1):51–56.
- Pillet S, Pozzetto B, Jarlot C, et al. Management of cytomegalovirus infection in inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis*. 2012;44(7):541–548.
- Leveque N, Brixi-Benmansour H, Reig T, et al. Low frequency of cytomegalovirus infection during exacerbations of inflammatory bowel diseases. *J Med Virol*. 2010;82(10):1694–1700.
- Yoshino T, Nakase H, Matsuura M, et al. Effect and safety of granulocyte-monocyte adsorption apheresis for patients with ulcerative colitis positive for cytomegalovirus in comparison with immunosuppressants. *Digestion*. 2011;84(1):3–9.
- Akintola-Ogunremi O, Luo Q, He TC, Wang HL. Is cytomegalovirus associated with human colorectal tumorigenesis? *Am J Clin Pathol*. 2005;123(2):244–249.
- Söderberg-Naucler C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory disease and cancer? *J Int Med*. 2006;259(3):219–462.
- Harkins L, Volk AL, Samanta M, et al. Specific localization of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet*. 2002;360:1557–1563.
- Chen HP, Jiang JK, Chen CY, et al. Human cytomegalovirus preferentially infects the neoplastic epithelium of colorectal cancer: a quantitative and histological analysis. *J Clin Virol*. 2012;54(3):240–244.
- Mariguella VC, Chancha SG, Cunha Ade A, et al. Cytomegalovirus in colorectal cancer and ulcerative colitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50(2):83–87.
- Knösel T, Schewe C, Dietel M, Petersen I. Cytomegalovirus is not associated with progression and metastasis of colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2004;211(2):243–247.
- Park JM, Choi MG, Kim SW, et al. Increased incidence of colorectal malignancies in renal transplant recipients: a case control study. *Am J Transplant*. 2010;10(9):2043–2050.
- Collins MG, Teo E, Cole SR, et al. Screening for colorectal cancer and advanced colorectal neoplasia in kidney transplant recipients: cross sectional prevalence and diagnostic accuracy study of faecal immunochemical testing for haemoglobin and colonoscopy. *BMJ*. 2012;343: e4657 [Abstract].
- Adani GL, Baccarani U, Lorenzin D, et al. Role of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in patients with de novo colon cancer after renal transplantation. *Tumori*. 2006;92(3):219–221.
- Kutikhin AG, Yuzhalin AE, Brusina EB, Briko NI. Role of infectious agents in the emergence of malignant tumours. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol*. 2012;5:104–114 [Abstract].
- Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011;12(5):504–512.
- Bonders G, Maussang D, Muniz LR, et al. The cytomegalovirus-encode chemokine receptor US28 promotes intestinal neoplasia in transgenic mice. *J Clin Invest*. 2010;120(11):3969–3978.
- Kofman A, Marcinkiewicz L, Dupart E, et al. The role of viruses in brain tumour initiation and oncomodulation. *J Neurooncol*. 2011;105(3):451–466.
- Bhattacharjee B, Renzette N, Kowalik TF. Genetic analysis of cytomegalovirus in malignant gliomas. *J Virol*. 2012;86(2):6815–6824.
- Ranganathan P, Clark PA, Kuo JS, et al. Significant association of multiple human cytomegalovirus genomic Loci with glioblastoma multiforme samples. *J Virol*. 2012;86(2): 854–864.
- Barami K. Oncomodulatory mechanisms of human cytomegalovirus in gliomas. *J Clin Neurosci*. 2010;17(7):819–823.
- Cinat J Jr, Vogel JU, Kotchetkov R, Doerr HW. Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for tumor progression. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28(1):59–77.
- Cobbs CS, Soroceanu L, Denham S, et al. Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity. *Cancer Res*. 2008;68(3):724–730.
- Soroceanu L, Matlaf L, Bezrookove V, et al. Human cytomegalovirus US28 found in glioblastoma promotes an invasive and antigenic phenotype. *Cancer Res*. 2011;71(21):6643–6653.
- Michaelis M, Doerr HW, Cinat J. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia*. 2009;11(1):1–9.
- Johnsen JJ, Baryawno N, Söderberg-Naucler C. Is human cytomegalovirus a target in cancer therapy? *Oncotarget*. 2011;12(2):1329–1338.
- Dyurzynski K, Chang SM, Heimberger, et al. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2012;14(3):246–255.



# Primární meningokoková konjunktivitida s rozvojem invazivního onemocnění

L. PETROUŠOVÁ, L. ROŽNOVSKÝ

*Klinika infekčního lékařství, Fakultní nemocnice Ostrava*

## SOUHRN

Petroušová L., Rožnovský L.: **Primární meningokoková konjunktivitida s rozvojem invazivního onemocnění**

*Neisseria meningitidis* je vzácným původcem hnisavých konjunktivitid. Přibližně u čtvrtiny pacientů s meningokokovou konjunktivitidou se následně rozvine invazivní onemocnění, a proto je u meningokokové konjunktivitidy indikována antibiotická léčba. Uvádíme kazuistiku šestiměsíčního kojence, u kterého došlo za 24 hodin po vzniku purulentní meningokokové konjunktivitidy k rozvoji meningokokové sepsy s meningitidou s následným příznivým průběhem onemocnění.

*Klíčová slova: Neisseria meningitidis, konjunktivitida, sepsy*

## SUMMARY

Petroušová L., Rožnovský L.: **Primary meningococcal conjunctivitis with the development of a systemic disease**

*Neisseria meningitidis* is a rare cause of acute bacterial conjunctivitis. Systemic meningococcal disease follows meningococcal conjunctivitis in approximately one quarter of patients. Systemic antibiotic treatment is indicated in the case of meningococcal conjunctivitis to prevent spread of infection. We report 6-month-old boy who presented with meningococcal conjunctivitis and developed sepsis and meningitis in 24 hours. The course of the disease was favorable.

*Keywords: Neisseria meningitidis, conjunctivitis, sepsis*

*Klin mikrobiol inf lék 2013;19(3):107–108*

**Adresa:** MUDr. Lenka Petroušová, Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 00 Ostrava, e-mail: lenka.petrousova@gmail.com

Došlo do redakce: 9. 8. 2013

Přijato k tisku: 23. 9. 2013

## Úvod

*Neisseria meningitidis* osidluje hlavně horní dýchací cesty. Po kolonizaci nosohltanu u většiny osob vzniká bezpříznakové nosičství, jen raritně dochází k přestupu meningokoků do krve a vzniku invazivního onemocnění, které se většinou manifestuje jako meningitida, sepsy nebo kombinace obou forem onemocnění, méně častá je akutní meningokokémie. Mezi vzácné formy onemocnění, které jsou rovněž svázány s úvodním přestupem meningokoků do oběhu, se řadí chronická meningokokémie, purulentní perikarditida, artritida, pneumonie, endokarditida, epiglottitida nebo peritonitida [1].

Meningokoky mohou vzácně kolonizovat sliznice spojivky nebo urogenitálního traktu. K přenosu na spojivku může dojít kapénkovou infekcí nebo se jedná o autoinokulaci, při které má jedinec pozitivní nález meningokoků i v nosohltanu. Přítomnost meningokoka na urogenitálních sliznicích souvisí s orogenitálním přenosem. Postižení sliznic se může manifestovat jako meningokoková konjunktivitida nebo uretritida s následným rozvojem invazivního meningokokového onemocnění, což bylo zaznamenáno u 10–29 % pacientů s meningokokovou konjunktivitidou [1–4]. V kazuistice je prezentována meningokoková konjunktivitida s následným rozvojem invazivního onemocnění.

## Kazuistika

V říjnu 2009 byl na Klinice infekčního lékařství v Ostravě

hospitalizován šestiměsíční kojenec s meningokokovou sepsí a meningitidou. Jednalo se o dosud zdravé dítě, perinatálně nebyly přítomny rizikové faktory. Den před přijetím k hospitalizaci matka dítěte pozorovala hnisavou sekreci z levého oka, dítě bylo vyšetřeno praktickým pediatrem, který provedl stěr ze spojivky a doporučil aplikovat oční kapky. Pro rozvoj teplot a zvracení bylo dítě následující den ošetřeno znovu u praktického lékaře, při orientačním vyšetření C reaktivního proteinu (CRP) byl výsledek 129 mg/l a dítě bylo odesláno s diagnózou počínajícího septického stavu na spádové dětské oddělení. V klinickém obrazu při přijetí dominovala hnisavá konjunktivitida levého oka, neklid dítěte a teploty. Laboratorní hodnoty odpovídaly orientačnímu vyšetření u praktického lékaře, hodnota CRP byla 140 mg/l, prokalcitonin měl hodnotu 4 ug/l, hodnota leukocytů byla  $13,0 \cdot 10^9/l$ . Dítě bylo léčeno cefotaximem v dávce 100 mg/kg/den. Druhý den hospitalizace bylo k dispozici bakteriologické vyšetření ze spojivkového vaku s průkazem *Neisseria meningitidis*. Na základě uvedeného výsledku byla provedena lumbální punkce s průkazem meningitidy (elementy  $300/mm^3$ , s převahou segmentů, bílkovina 0,76 g/l). Dítě bylo téhož dne přeloženo na Kliniku infekčního lékařství v Ostravě, při přijetí bylo subfebrilní, neklidné, s pozitivními meningeálními příznaky, s mírně zarudlou levou spojivkou, ale bez krvácivých projevů na kůži. Při vstupním laboratorním vyšetření došlo k elevaci CRP na 279 mg/l, prokalcitonin byl 7,15 ug/l a byla přítomna mírná koagulo-



Tabulka 1  
Vývoj laboratorních parametrů během hospitalizace

Hospitalizace	1. den	2. den	5. den	9. den
CRP (mg/l)	140	279	71	3
Prokalcitonin (ug/l)	4,0	7,15	2,65	
Leukocyty (10 <sup>9</sup> /l)	11,0	13,0	10,0	12,8
Elementy v likvoru (mm <sup>3</sup> )		300 (převaha segmentů)	500 (převaha segmentů)	
Bílkovina v likvoru (g/l)		0,76	0,78	

patie (Quickův čas 67 %, INR 1,34, aPTT 38,9 s, fibrinogen 6,26 g/l) s normálními hodnotami trombocytů. Pro neklid dítěte byla provedena kontrolní lumbální punkce 5. den hospitalizace, ve které přetrvával zánětlivý nález (elementy 500/mm<sup>3</sup>, převaha segmentů, bílkovina 0,78 g/l). Vývoj laboratorních parametrů je uveden v tabulce 1. Terapeutická dávka cefotaximu byla zvýšena od přijetí na 200 mg/kg/den, celková doba antibiotické léčby byla 10 dnů. Průběh hospitalizace byl příznivý, postupně odezněl neklid dítěte, nerozvinula se žádná ložisková neurologická symptomatologie. Vzhledem k dobrému klinickému stavu dítěte další lumbální punkce již nebyla prováděna. Otorinolaryngologické vyšetření a neurologické vyšetření včetně EEG a evokovaných sluchových potenciálů (BAEP) byla v normě, porucha sluchu nebyla prokázána.

*Neisseria meningitidis* skupiny B byla prokázána ve steru ze spojivkového vaku, což v úvodu onemocnění provedl praktický lékař, a v hemokultuře, která byla vyšetřena před nasazením antibiotické léčby. V likvoru byl pozitivní průkaz meningokoka polymerázovou řetězovou reakcí, mikroskopické vyšetření likvoru i kultivace byla již negativní. Ve steru z nosohltanu byla prokázána pouze běžná bakteriální flora, ale odběr byl proveden až po nasazení antibiotik.

Celková doba hospitalizace na obou pracovištích byla 15 dnů, dítě bylo propuštěno v dobrém stavu, psychomotorický vývoj dítěte za 2 roky po onemocnění odpovídal normě.

## Diskuze

Kazuistika pacienta s meningokokovou konjunktivitidou, která patří mezi vzácné slizniční formy meningokokového onemocnění, nebyla v posledních letech v českém písemnictví uvedena. Meningokokové konjunktivitidy tvoří jen 0,1–2 % všech konjunktivitid, i když zastoupení nemusí být přesné vzhledem k malému počtu odebíraných bakteriálních kultivací při zánětu spojivek [2]. Meningokoková konjunktivitida může být primární nebo sekundární. Primární meningokoková konjunktivitida se vyskytuje jako izolované neinvazivní onemocnění nebo konjunktivitida s invazivní formou onemocnění, zejména meningitidou nebo sepsí. Sekundární metastatická konjunktivitida se rozvine až jako komplikace invazivního meningokokového onemocnění [3,5]. Meningokoková konjunktivitida většinou bývá jednostranná, typická je purulentní sekrece z postiženého oka, mohou být přítomny i hemoragie [2,6]. U primární konjunktivitidy je exogenním zdrojem např. jiný nosič s kolonizací nosohltanu, vzácně u novorozenců matka s kolonizací v porodních cestách, nebo endogenním zdrojem je kolonizací nosohltanu samotného pacienta [7]. Lokální komplikace konjunktivitidy se rozvinou u 15 % pacientů, nejčastější je vřed rohovky, vzácně se může jednat o závažnou en-

doftalmitidu [2,5,8]. Systémové komplikace se vyskytují u 10–29 % pacientů, nejčastější je meningitida a sepse [2,3,4]. K rozvoji systémových komplikací, což jsou invazivní formy meningokokového onemocnění, dochází během několika hodin až 4 dnů od začátku konjunktivitidy [2,6,8]. Ve shodě s literárními údaji došlo u našeho dítěte s primární jednostrannou purulentní konjunktivitidou k rozvoji invazivního onemocnění do 24 hodin od začátku konjunktivitidy. U primární konjunktivitidy se všeobecně doporučuje systémové podání antibiotik, což výrazně snižuje (až 19x) riziko rozvoje systémových komplikací v porovnání s pacienty léčenými pouze lokálními antibiotiky [2,4,6,9]. Náš pacient byl léčen parenterálně antibiotiky od 2. dne onemocnění pro klinickou manifestaci počínajícího septického stavu. K příznivému průběhu onemocnění přispěla časná diagnostika praktickým lékařem, vzorně provedená kultivace ze spojivkového vaku a následné odeslání k hospitalizaci.

Někteří autoři zvažují profylaktickou léčbu blízkých kontaktů pacientů s meningokokovou konjunktivitidou, neboť např. kanadští autoři popsali úmrtí matky dítěte s primární neinvazivní konjunktivitidou [4,9]. U rizikových kontaktů našeho dítěte byla rovněž použita antibiotická profylaxe, což ale souviselo s tím, že náš pacient splňoval kritéria invazivního meningokokového onemocnění [1,10].

## Závěr

U pacientů s purulentní konjunktivitidou je vhodné kulti-vační vyšetření ze spojivky, v případě záhytu meningokoků je nutné včasné systémové podání antibiotik ke snížení rizika rozvoje invazivního meningokokového onemocnění.

## Literatura

- Křížová P, Rožnovský L. Meningokokové onemocnění. 1. vyd. Maxdorf; 2011.
- Barguet N, Gasser I, Domingo P, et al. Primary meningococcal conjunctivitis: Report of 21 patients and review. *Rev Infect Dis*. 1990;12:838–847.
- Orden B, Martínez R, Millán R, et al. Primary meningococcal conjunctivitis. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(12):1245–1247.
- Bigham JM, Hutcheon ME, Patrick DM, et al. Death from invasive meningococcal disease following close contact with a case of primary meningococcal conjunctivitis-Langley, British Columbia, 1999. *Can Commun Dis Rep*. 2001;27(2):13–18.
- Chien SY, Sung TC, Mu SC, et al. Endophthalmitis as a complication of meningococcal meningitis: report of one case. *Acta Paediatr Taiwan*. 1999;40(2):116–118.
- Tejwani D, Von Lany H, Reck A, et al. Haemorrhagic conjunctivitis as an initial manifestation of systemic meningococcal disease. *Eye (Lond)*. 2001;15:235–236.
- Fiorito SM, Galarza PG, Sparo M, et al. An unusual transmission of *Neisseria meningitidis*: neonatal conjunctivitis acquired at delivery from the mother's endocervical infection. *Sex Transm Dis*. 2001;28(1):29–32.
- Yeung WL, Yam KL, Chan WM, et al. Red eyes as the initial presentation of systemic meningococcal infection. *J Paediatr Child Health*. 2003;39(5):390–391.
- Daud J, Ishak SR, Deris ZZ, et al. Excellent outcome of primary *Neisseria meningitidis* keratoconjunctivitis. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011;1(5):419–420.
- Ministerstvo zdravotnictví ČR: Metodický návod k epidemiologickým opatřením v ohnisku invazivního meningokokového onemocnění. *Věstník MZ ČR*. 1994;8,25.2.