

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 Chmelář, 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 UK, 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.

OBSAH

ÚVODNÍK

S. Plíšek

135

PŮVODNÍ PRÁCE

Spontánní baktériová peritonitida

*L. Skladaný, S. Kášová, A. Purgelová, N. Bystrianska,
S. Adamcová-Selčanová*

136

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Nová definice sepse a septického šoku – Sepsis-3

M. Holub, O. Beran

141

Epidemický výskyt SARG na novorozenecké JIRP

L. Hobzová, M. Šplího, R. Chlíbek, H. Žemličková, L. Ryšková

148

NK buňky klasické a méně známé

S. Frydrychová, V. Boštíková, P. Boštík

152

Využití metody MALDI-TOF MS k přímé identifikaci bakterií z klinického materiálu

R. Tarabová, J. Bardoň

161

KAZUISTIKA

Laktátová acidóza při kumulaci metforminu jako komplikace akutní gastroenteritidy

O. Džupová, J. Kulichová

144

ZPRÁVA

Zpráva z kongresu SepsEast 2016

M. Holub

166



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://kmil.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

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

Všechny příspěvky kromě zpráv a dopisů redakci procházejí nezávislou recenzí.

Vychází 4x ročně, roční předplatné 540,- 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 inzercí. 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. 3rd 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., 1st 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. 2nd Med. Fac. Prague

MUDr. Hanuš Rozsypal, CSc.
Dept. of Infect. Dis., 1st 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. 2nd Med. Fac., Prague

Doc. MUDr. Marie Staňková, CSc.
Dept. Infect. Dis., 1st 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



spol. s r. o.

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://kml.trios.cz

Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Mgr. Hedvika Nevečeralová

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

S. Plíšek

135

ORIGINAL ARTICLE

Spontaneous bacterial peritonitis

*L. Skladaný, S. Kásová, A. Purgelová, N. Bystrianska,
S. Adamcová-Selčanová*

136

REVIEWS

New definitions for sepsis and septic shock – Sepsis-3

M. Holub, O. Beran

141

Outbreak of SARG in a neonatal intensive care unit

L. Hobzová, M. Šplíňo, R. Chlíbek, H. Žemličková, L. Ryšková

148

Classical and less known NK cells

S. Frydrychová, V. Boštíková, P. Boštík

152

The use of MALDI-TOF MS for direct identification of bacteria in clinical specimens

R. Tarabová, J. Bardoň

161

CASE REPORT

Lactic acidosis due to metformin accumulation complicating acute gastroenteritis

O. Džupová, J. Kulichová

144

NEWS

3rd Central and Eastern European Sepsis Forum

M. Holub

166

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, vážení kolegové, milí přátelé,

s mírným zpožděním dostáváte do rukou poslední, čtvrté číslo 22. ročníku našeho časopisu „Klinická mikrobiologie a infekční lékařství“. Pevně věřím, že obsah Vás opět zaujme a jednotlivá sdělení budou pro Vás poučením.

Původní práce autorů z Bánské Bystrice „Spontánní bakteriová peritonitída“ je prospektivní kohortovou observační pragmatickou studií, která se týká SBP. Autoři upozorňují, že je třeba klást důraz na včasnou diagnostiku tohoto onemocnění a na neodkladné nasazení antibiotické léčby podle konkrétní epidemiologické situace a citlivosti mikrobiálních původců v regionu. Tímto opatřením dosáhli významné redukce mortality.

Kolegové z 1. LF UK a ÚVN nás seznamují s novou definicí sepse a septického šoku. Nová definice posouvá problematiku podstatně více do intenzivní péče, neboť klade důraz na orgánová selhání a připomíná možnost použití nového systému skórování – tzv. quick SOFA.

Hradečtí autoři podávají informace o epidemickém výskytu kmene *Staphylococcus aureus* s rezistencí ke gentamicinu na novorozenecké JIRP. Byl získán přehled o jeho výskytu u pacientů, personálu a v nemocničním prostředí. Výstupem bylo zpřísnění hygienicko-protiepidemického režimu a zdůraznění významu racionální antibiotické terapie.

Kolegové z Fakulty vojenského zdravotnictví UO v Hradci Králové si ve svém sdělení všímají nových rolí NK buněk při virových infekcích, rozvoji autoimunity a jejich specifických funkcí v některých orgánech.

Práce z olomoucké fakultní nemocnice nás seznamuje s použitím metody MALDI-TOF MS, která umožňuje rychlou identifikaci bakterií z krve, moči a mozkomíšního moku.

Poslední zajímavou prací je kazuistika autorů z 3. LF UK v Praze, kde je upozorněno na možnost vzniku laktátové acidózy při kumulaci metforminu. Autoři popisují sérii tří pacientů, kteří byli přijati pro akutní průjemové onemocnění a u kterých se během několika hodin rozvinul obraz šoku.

Milí přátelé, přeji Vám, abyste strávili klidné a příjemné chvíle nad stránkami našeho časopisu.

Pevné zdraví, hodně úspěchů v pracovním a osobním životě v roce 2017 přeje

doc. MUDr. Stanislav Plíšek, Ph.D.
zástupce šéfredaktora

Spontánná bakteriová peritonitída

L. SKLADANÝ¹, S. KÁSOVÁ¹, A. PURGELOVÁ², N. BYSTRIANSKA¹,
S. ADAMCOVÁ-SELČANOVÁ¹

¹II. Interná klinika SZÚ, Fakultná nemocnica s poliklinikou F. D. Roosevelta, Banská Bystrica,
²Oddelenie klinickej mikrobiológie, Fakultná nemocnica s poliklinikou F. D. Roosevelta, Banská Bystrica

SÚHRN

Skladaný L., Kásová S., Purgelová A., Bystrianska N., Adamcová-Selčanová S.: **Spontánná bakteriová peritonitída**

Úvod: Spontánná bakteriová peritonitída (SBP) je najčastejšia infekčná komplikácia cirhózy pečene so závažnými dôsledkami. SBP je v úvode vždy liečená antibiotikami (ATB) empiricky, nie cielene. Nakoľko retrospektívna štúdia z nášho pracoviska [4] ukázala suboptimálnu účinnosť empirickej ATB liečby podľa odporúčani EASL [2] – len 40 %, pristúpili sme k zmene protokolu. Cieľom tejto prospektívnej štúdie bolo zistiť 1) incidencia a charakteristiky SBP v reálnej klinickej praxi – na hepatologickej jednotke koncovej nemocnice, 2) účinnosť novozvolenej empirickej ATB liečby, ktorá bola vybratá na základe analýzy spektra patogénov a ich rezistencií na antibiotiká, zistených v retrospektívnej kohorte so SBP na našom pracovisku, 3) mortalitu; a 4) porovnať tieto zistenia s údajmi z literatúry.

Materiál a metódy: Prospektívna kohortová observačná pragmatická štúdia. Kontext: Hepatologické, gastroenterologické a transplantčné oddelenie (HEGITO) II. internej kliniky SZÚ FNŠP FDR v Banskej Bystrici (FNŠP FDR BB). Interval: november 2012–august 2013. Vstupné kritériá: hospitalizácia pre cirhózu pečene; ascites \geq 2. stupňa; informovaný súhlas; štúdia bola schválená Etickou komisiou FNŠP FDR BB. Vylučovacie kritériá: malignita, sekundárna bakteriová peritonitída. Diagnóza: SBP definoval počet neutrofilov v ascite (NeA) \geq 250/mm³. Pozitívna kultivácia nebola podmienkou diagnózy; na kultiváciu sa každému pacientovi odobrala 10 ml vzorka ascitickej tekutiny do dvoch nádob na hemokultúru – anaeróbnej a aeróbnej. Odpoveď na liečbu bola definovaná ako pokles NeA na 25% východzej hodnoty po 48–72 hodinách [2]; absencia odpovede bola indikáciou na zmenu stratégie ATB liečby. Empirická ATB liečba: Liekom prvej voľby bol piperacilin/tazobaktám 4 g/0,5 g i.v. každých 8 hod. počas 5 dní; súčasťou liečebného protokolu bolo podanie 20% ľudského albumínu v dávke 1,5 g/kg hmotnosti pacienta na prvý a 1 g/kg hmotnosti pacienta tretí deň diagnózy. Ak nedošlo k odpovedi na liečbu, siahlo sa a) k empirickej ATB liečbe 2. voľby podľa analýzy spektra patogénov a ich rezistencií zistených v predchádzajúcej retrospektívnej štúdií z nášho pracoviska zameranej na SBP – ertapenem 1 g i.v. každých 24 hod. počas 5 dní alebo b) k cielej ATB liečbe podľa medzičasom získanej kultivácie ascitu.

Výsledky: Vstupné kritériá boli splnené u 65 pacientov (99 epizód), incidencia SBP bola 9 z 99 epizód (9,10 %); kultivačný záchyt v 5 z 9 epizód (56 %), z toho Gram pozitívne (G⁺) mikroorganizmy v 4 z 5 epizód (89 %). Terapeutická odpoveď na empirické ATB bola prítomná v 7 z 9 epizód (78 %). Mortalita počas hospitalizácie bola 11 %.

Záver: SBP sa zistila u jedného z desiatich pacientov s cirhotickým ascitom. Výber empirickej liečby podľa pravidiel ATB stewardshipu viedlo k zvýšeniu terapeutickému odpovede pri SBP na viac ako 75 %. Účinná liečba SBP je podmienkou na zníženie mortality.

Kľúčové slová: cirhóza, ascites, spontánná bakteriová peritonitída, acute-on-chronic liver failure, antibiotická liečba

SUMMARY

Skladaný L., Kásová S., Purgelová A., Bystrianska N., Adamcová-Selčanová S.: **Spontaneous bacterial peritonitis**

Aim of study: Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) is the most frequent infectious complication of liver cirrhosis with serious consequences. Initially, SBP is always treated with empirical, not targeted, antibiotic therapy. Since a retrospective study performed in our department [4] showed suboptimal effectiveness (only 40 %) of empirical antibiotic therapy in accordance with the EASL guidelines [2], a decision was made to change the protocol. The aims of this prospective study were to determine (1) the incidence and characteristics of SBP in real clinical practice – in a liver unit of a tertiary hospital, (2) the effectiveness of new antibiotic therapy selected based on analysis of the spectrum of pathogens and their resistance to antibiotics as identified in a retrospective cohort study on SBP carried out in our department, (3), mortality, and to compare these findings with the literature data.

Material and methods: A prospective cohort observational pragmatic study. Setting: Department of Hepatology, Gastroenterology and Liver Transplantation, 2nd Internal Clinic, Slovak Medical University and F. D. Roosevelt Teaching Hospital with Polyclinic in Banská Bystrica. Time interval: November 2012–August 2013. Inclusion criteria: hospitalization for liver cirrhosis, ascites \geq grade 2, informed consent. The study was approved by the local ethics committee. Exclusion criteria: malignancy, secondary bacterial peritonitis.

Diagnosis: SBP was defined by the count of neutrophil leukocytes in ascites (NeA \geq 250/mm³). Positive ascitic fluid culture was not a necessary condition for the diagnosis. From each patient, 10 mL of ascitic fluid were sampled into two blood culture bottles, anaerobic and aerobic. Therapeutic response: defined as a decrease in NeA to 25 % of the baseline value after 48–72 hours, in accordance with the EASL guidelines [2]. The absence of response was indication for change of the antibiotic therapy strategy. Empirical antibiotic therapy: The drug of choice was piperacillin/tazobactam 4 g/0.5 g i.v. every 8 hours for 5 days. Additionally, 20% human albumin at doses of 1.5 g/kg of patient weight on day 1 and 1.0 g/kg of patient weight on day 3 from the diagnosis was administered. If there was no response, (a) second choice antibiotic therapy according to analysis of the spectrum of pathogens and their resistance as identified in the former retrospective study on SBP, that is, ertapenem 1g i.v. every 24 hours for 5 days, or (b) targeted antibiotic therapy according to analysis of ascitic fluid culture performed in the meantime was initiated.

Results: The inclusion criteria were met by 65 patients (99 episodes); the incidence of SBP was 9 out of 99 episodes (9.1 %); 5 out of the 9 cases had positive bacterial culture (56 %), with most of bacteria being Gram-positive (4 out of 5 cases, 89 %). Therapeutic response was documented in 7 out of the 9 cases (78 %). The in-hospital mortality of patients with SBP was 11 %.

Conclusions: SBP was detected in one out of ten patients with cirrhotic ascites. The selection of empirical therapy in accordance with the principles of antibiotic stewardship led to an increase in therapeutic response to more than 75 %. Effective treatment of SBP is a prerequisite for reduction of mortality.

Keywords: cirrhosis, ascites, spontaneous bacterial peritonitis, acute-on-chronic liver failure, antibiotic therapy

Klin mikrobiol inf lék 2016;22(4):136–140

Adresa: MUDr. Silvia Kásová, II. interná klinika SZÚ, Fakultná nemocnica s poliklinikou F. D. Roosevelta, Nám. L. Svobodu 1, 975 17 Banská Bystrica, Slovenská republika, e-mail: silvia.kasova@gmail.com

Došlo do redakcie: 9. 11. 2016

Prijato k tisku: 20. 1. 2017

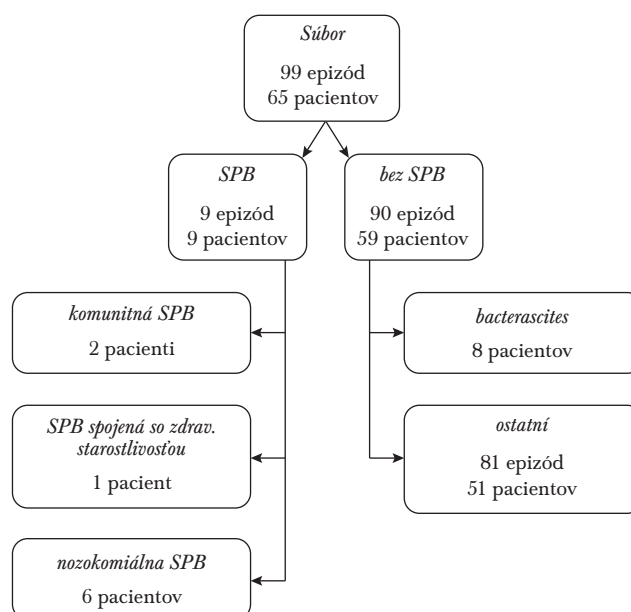
Úvod

Spontánna baktériová peritonitída (SBP) je infekcia ascitickej tekutiny pri neprítomnosti perforácie čreva alebo iného vnútrobrušného zdroja infekcie [1]. Je to špecifická a veľmi častá infekčná komplikácia u pacientov s cirhózou pečene a ascitom [2]. Bakteriálne infekcie sú u pacientov s cirhózou pečene veľkým problémom. Ich prevalencia je vysoká: 30–40 % pacientov prijatých do nemocnice má infekciu pri prijíme alebo sa u nich rozvinie v priebehu hospitalizácie a je spojená s vysokou krátkodobou mortalitou [3]. SBP tvorí 10–30 % všetkých bakteriálnych infekcií u hospitalizovaných pacientov s cirhózou [4,18]. U asymptomatických ambulantných pacientov je prevalencia nízka (3,5 %), ale rapídne stúpa pri pacientoch vyžadujúcich opakované hospitalizácie (nozokomiálna SBP, SBP spojená so zdravotnou starostlivosťou), kde dosahuje 8–36 % [5]. Mortalita vďaka včasnej diagnostike a antibiotickej liečbe poklesla z 90 % v čase prvého popisu tejto choroby na približne 20–40 % v súčasnosti. Riziko rekurencie SBP do jedného roka po vyliečení prvej epizódy je 70 %, hľadajú sa preto spôsoby sekundárnej prevencie [6]. Ročné prežívanie po epizóde SBP je 30–50 %, dvojročné prežívanie len 25–30 % [1]. Mortalita dosahuje až 20–40 %, a to jednak na vrub nedostatočnej odpovede na širokospektrálnu empirickú antibiotickú liečbu podávanú podľa európskych odporúčaní bez ohľadu na regionálne odlišnú citlivosť mikróbov na konkrétne antibiotiká a tiež preto, lebo bakteriálna infekcia sa môže stať spúšťačím faktorom ACLF (acute-on-chronic liver failure), čiže zlyhávania pečene, obličiek, mozgu, koagulácie, cirkulácie a pľúc. ACLF vzniká častejšie u cirhotických pacientov so spontánnou baktériovou peritonitídou a pneumóniou, než pri infekciách iných lokalít [7]. Najobávanejšou komplikáciou SBP je hepatorenálny syndróm I. typu (HRS 1). Súčasťou liečby SBP je preto podávanie 20% ľudského albumínu, ktorý významne znižuje riziko vzniku HRS 1 [8]. Zároveň vzrastá nutnosť identifikovať populáciu pacientov so zvýšeným rizikom rozvoja spontánnej baktériovej peritonitídy a v indikovaných prípadoch použiť vhodné antibiotiká v primárnej a sekundárnej prevencii. Antibiotická profylaxia je u pacientov s cirhózou široko a úspešne využívaná. Kým krátkodobá profylaxia znižuje incidenciu bakte-

riálnych infekcií a má nízky až žiadny vplyv na vytvorenie rezistencie, dlhodobá liečba, hoci aj efektívna, vedie v konečnom dôsledku k nárastu rezistencie. Preto sa hľadajú nové alternatívne prístupy k profylaxii vrátane postupov ovplyvňujúcich rozvoj bakteriálnej infekcie, predovšetkým na úrovni bakteriálnej translokácie cez stenu čreva. Výskyt

Graf 1

Schematické znázornenie súboru pacientov podľa prítomnosti spontánnej bakteriálnej peritonitídy (SBP). Pacientov s prítomnou SBP je možné rozdeliť na tri skupiny: komunitná SBP, SBP spojená so zdravotnou starostlivosťou a nozokomiálna SBP. V skupine pacientov bez SBP je možné vyčleniť pacientov s tzv. bacterascitom (t.j. pozitívna kultivačného vyšetrenia pri normálnom počte neutrofilov v ascite).



a ďalšie charakteristiky SBP na Slovensku sú pomerne málo preskúmané. Existuje len jedna retrospektívna štúdia kohorty 122 pacientov (185 epizód) so SBP v intervale rokov 2009–2011 [4], v ktorej bola vyhodnotená účinnosť empirickej liečby SBP cefotaximom – podľa vtedy aktuálnych odporúčení Európskej spoločnosti pre štúdium pečene (EASL) – preukázala 40% účinnosť empirickej liečby a 22% úmrtnosť počas hospitalizácie; suboptimálne výsledky sa zároveň stali podkladom pre súčasnú štúdiu so zmeneným liečebným protokolom a s cieľom vyhodnotiť jeho modifikáciu (považuje sa preto za pragmatickú); zmena antibiotickej stratégie bola podriadená pravidlám tzv. stewardshipu, t.j. bola vybratá v spolupráci HEGITO a Oddelenia klinickej mikrobiológie na základe spoločnej analýzy vtedy aktuálnej epidemiologickej situácie a citlivosti bakteriálnych agens. Do empirickej liečby bol na základe tejto analýzy vybratý piperacilín – tazobaktám.

Klinický obraz, diagnostika, liečba. SBP prebieha obvykle nenápadne, nezriedka sa prejaví hlavne cez iné orgánové systémy – akútne poškodenie obličiek, krvácanie pri portálnej hypertenzii, hepatálnu enceflopatiu, alebo ACLF; často, nie však vždy, sú prítomné znaky vnútrobrušnej infekcie s bolesťami, prejavy peritonitídy podľa chirurgických pravidiel sú však zriedkavé; prejavy SIRS sú súčasťou klinického obrazu vo väčšine prípadov. Kľúčovým bodom diagnostiky a zároveň jediným nevyhnutným diagnostickým kritériom je počet neutrofiných leukocytov nad 250 v mm³ ascitu získaného paracentézou. Kultivácia ascitu býva pozitívna v približne 40 % prípadov [2,9]. V minulosti prevažovali gramnegatívne aeróbne baktérie, najmä *E. coli*. Novšie štúdie poukazujú na nárast podielu grampozitívnych mikroorganizmov, najmä u pacientov na preventívnej liečbe norfloxacinom, ako aj zvýšený výskyt multirezistentných mikroorganizmov. Tento nárast súvisí s častými hospitalizáciami pacientov s cirhózou a ascitom, dlhším prežívaním napriek vysokému stupňu dekompenzácie cirhózy, s osídlením kože, respiračného, črevného a urogenitálneho traktu nemocničnými kmeňmi baktérií, ako aj so syndrómom imunodeficitu spojeného s cirhózou (CAID), dysmikrobiou (zmenou mikrobióty čreva), s preventívnym užívaním ATB a s invazívnymi výkonmi [10–12,4]. Stúpa význam rozdelenia SBP na komunitnú SBP – vznik do 48 hod. od prijatia do nemocnice, bez kontaktu so zdravotnou starostlivosťou za

posledných 30 dní, bez hospitalizácie za posledné 3 mesiace, s prevahou gramnegatívnych agens, a nozokomiálnu SBP – vznik po viac ako 48 hod. od prijatia do nemocnice, pacient je už osídlený nemocničnou flórou, s prevahou grampozitívnych baktérií. Niektorí autori rozlišujú ešte tretiu kategóriu, SBP spojená so zdravotnou starostlivosťou – vznik do 48 hod. od prijatia do nemocnice, ale pacient bol predtým v kontakte so zdravotnou starostlivosťou [13]. Praktický význam tohoto rozdelenia spočíva v odlišnom prístupe k empirickej antibiotickej liečbe. V súčasnosti pribúdajú štúdie o stúpajúcej rezistencii baktérií na antibiotiká preferované v odporúčaniach [2]. Rezistencia na cefalosporín 3. generácie sa vyskytuje približne v 21,5 % prípadov. Je pomerne nízka pri komunitnej SBP (7,1 %), stredná pri SBP súvisiacej so zdravotnou starostlivosťou (21,1 %). Pri nozokomiálnej SBP je rezistencia na ceftriaxon až 40,9 %. Tieto fakty sa odrážajú aj na mortalite. Kým mortalita v skupine pacientov s komunitnou SBP bola pomerne nízka a u pacientov s SBP súvisiacou so zdravotnou starostlivosťou bola stredná, mortalita u pacientov s nozokomiálnou SBP bola oveľa vyššia. Rezistencia na cefalosporín 3. generácie sa ukázala ako nezávislý prediktívny faktor mortality [13]. Preto, hoci liečba cefalosporínom 3. generácie ostáva naďalej zlatým štandardom liečby infekcií získaných v komunite, empirická liečba nozokomiálnych infekcií a infekcií spojených so zdravotnou starostlivosťou sa má riadiť lokálnou epidemiologickou situáciou v konkrétnom regióne [14,15].

Materiál a metódy

Štúdia bola realizovaná na HEGITO (Hepatologicko-gastroenterologicko-transplantačnom oddelení) II. internej kliniky SZÚ, vo FNŠP F. D. Roosevelta v Banskej Bystrici. Prospektívne sa sledovali za sebou idúci hospitalizovaní pacienti s cirhózou pečene a ascitom počas 10 mesiacov – v časovom rozmedzí od 1. 11. 2012 do 31. 8. 2013. **Vstupné kritériá:** príjem na hospitalizáciu pre cirhózu pečene s ascitom; informovaný súhlas; štúdia bola schválená Etickou komisiou FNŠP FDR. **Vylučovacie kritéria:** malígny tumor, sekundárna bakteriálna peritonitída, nemožnosť získať úplné údaje. **Sledované premenné:** vek, rod, etiológia cirhózy pečene, štádium cirhózy podľa klasifikácie Child-Pugh, MELD skóre, časový odstup vzniku SBP od prijatia do ne-

Tabuľka 1

Incidencia spontánnej bakteriálnej peritonitídy (SBP) podľa vybraných ukazovateľov. Štatisticky významný vzťah sa potvrdil medzi SBP a stupňom dekompenzácie podľa MELD skóre.

	SBP	bez SBP	p
Vek	50,13 (30,45–60,06) rokov	56,82 (25,77–86,86) rokov	0,13
CPS	11,00 (7–14) bodov	10,13 (7–15) bodov	0,49
MELD	19,68 (4,94–40,34)	16,23 (1,22–46,76)	0,001

Poznámka: SBP – spontánna bakteriálna peritonitída, CPS – Child-Pugh score, MELD – model of end stage liver disease

mocnice, přítomnost terapeutické odpovědi s časovým odstupem 48 hodin od začátku ATB léčby, výsledky kultivace ascitu a citlivost na ATB, délka hospitalizace, náklady na léčbu, mortalita.

Výsledky

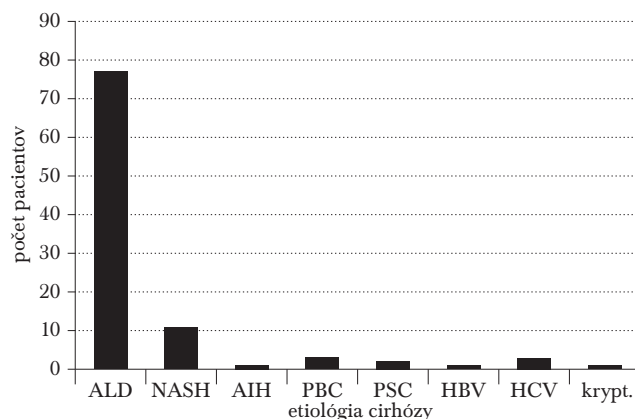
Vstupné kritéria vyseletovali 136 epizód, exkluzně vylúčili 37. Výsledný súbore teda tvorilo 99 epizód u 65 pacientov (vid' graf 1), z toho 71 epizód u mužov (72 %) a 28 u žien (28 %). Priemerný vek pacientov bol 56 rokov (26–86). Priemerný počet bodov podľa Child-Pugh klasifikácie štádia cirhózy pečene bol 10 (7–15 bodov), priemerný MELD dosahoval 16,5 (1,22–47). Vstupné charakteristiky kohorty sú uvedené v tabuľke (tabuľka 1). **Etiológia cirhózy:** alkoholová choroba pečene (ALD) 77 epizód (78 %), nealkoholová steatohepatitída (NASH) 11 (11 %); autoimunitná hepatitída (AIH) 1 (1,01 %), primárna biliárna cirhóza 3 (3,03 %); primárna sklerotizujúca cholangitída 2 epizódy (2,02 %), cirhóza pečene na podklade infekcie vírusom hepatitídy B 1 epizóda (1,01 %), cirhóza pečene na podklade infekcie vírusom hepatitídy C 3 epizódy (3,03 %), kryptogénna cirhóza 1 epizóda (1,01 %) (vid' graf 2). Výskyt SBP pri ALD (10 %) v porovnaní s inými etiologiami spolu (4 %) nebol signifikantne odlišný ($p = 0,40$). Sumárny počet epizód SBP bol 9 (9 %). Priemerný vek pacientov so SBP bol 50, rokov (30–66), bez SBP 57 rokov (26–87) ($p = 0,13$) (vid' tabuľka 1); muži vs ženy so SBP 6 (10 %) vs 3 (8 %) ($p = 0,72$). Child-Pugh skóre pri SBP vs bez SBP: 11 bodov (7–14), vs 10 (7–15) ($p = 0,49$) (vid' tabuľka 1). MELD skóre u pacientov so SBP vs bez SBP: 20 (5–40), vs 16 (1–47) ($p = 0,001$) (vid' tabuľka 1).

Kultivačné nálezy: Kultivačný záchyt bol 56 % (5 z 9 epizód). V 67 % sa jednalo o infekciu G+ bakteriálnym kmeňom, v 33 % o infekciu G- kmeňom (vid' graf 3). Zoznam G+ agens: *Corynebacterium* sp. (1 pac.), *Streptococcus bovis* (1 pac.), *Staphylococcus* sp. koaguláza negatívny (2 pac.). Z G- kmeňov sme kultivačne zachytili *E. coli* (1 pac.) a *Klebsiela oxytoca* (1 pac.). Z hľadiska subtypov SBP sa v 2 prípadoch z 9 jednalo o komunitnú SBP (22,22 %), SBP spojená so zdravotnou starostlivosťou bola v sledovanom súbore 1 (11,11 %), Zvyšok 6 z 9 epizód tvorila nozokomiálna SBP (66,67 %). U pacientov, ktorí mali komunitnú SBP sa vyvolávajúci agens nepodarilo vykultivovať, mikrobiálne spektrum sa teda nedalo porovnať.

Odpoveď na liečbu: V sledovanom súbore pacientov s SBP sa dosiahla odpoveď na iniciálnu empirickú ATB liečbu novou antibiotickou stratégiou piperacilínom/tazobaktámom u 7 z 9 epizód (77,78 %). Pacienti, ktorí odpoveď na iniciálnu liečbu nedosiahli, boli dvaja. V prvom prípade sa jednalo o pacienta s SBP v súvislosti so zdravotnou starostlivosťou, druhým bol pacient s nozokomiálnou SBP. 45 pacientov (50 %) bez SBP užívalo antibiotiká pre indikáciu inú ako SBP.

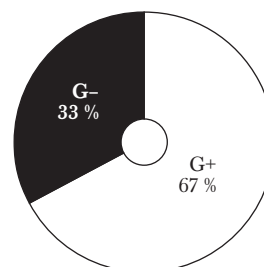
Mortalita: V súbore pacientov s cirhotickým ascitom bola mortalita 12,12 % (12 pacienti z 99). Z pacientov so SBP exitoval 1 pacient (11,11 %), mortalita ostatných pacientov,

Graf 2
Rozdelenie pacientov podľa etiológie cirhózy



Poznámka: ALD – alkoholová choroba pečene, NASH – nealkoholová steatohepatitída, AIH – autoimunitná hepatitída, PBC – primárna biliárna cholangitída, PSC – primárna sklerotizujúca cholangitída, HBV – vírusová hepatitída B, HCV – vírusová hepatitída C, krypt. – kryptogénna cirhóza

Graf 3
Mikrobiálne spektrum kultivačného záchytu u pacientov so spontánnou bakteriálnou peritonitídou (SBP): grampozitívne bakteriálne kmene (G+; n = 4, 67 %), gramnegatívne bakteriálne kmene (G-; n = 2, 33 %)



u ktorých sa nerozvinula SBP, ale mali iné komplikácie cirhózy pečene bola 12,22 % (11 pacientov z 90). Rozdiel nebol štatisticky významný ($p = 0,92$).

Diskusia

Incidencia SBP 9,10 % v súbore pacientov sa blíži k dolnej hranici incidence uvádzanej v literatúre [5], čo si vysvetľujeme vysokým podielom pacientov, ktorí užívali antibiotiká v liečbe non-SBP infekcií (až 50%). Zaznamenaný však bol vysoký podiel nozokomiálnych SBP (66,67 %). Vzťah SBP a štádia cirhózy pečene podľa Child-Pugh klasifikácie sa ukázal ako nesignifikantný. Ako signifikantná z hľadiska rizika rozvoja sa ukázala výška MELD skóre

($p = 0,001$). Tento údaj koreluje so zisteniami zo zahraničia, kde sa zistila aj korelácia výšky MELD skóre s mortalitou [16]. V etiológii cirhózy pečene dominovala alkoholová choroba pečene (ALD), a to u 77,78 % epizód. Tento pomer vzhľadom k inej etiológii cirhózy je identický aj v súboroch pacientov zo Slovenska sledovaných pre iné komplikácie cirhózy. Je odrazom závažnosti abúsu alkoholu ako celospoločenského problému v našej krajine. Táto skutočnosť je alarmujúca. Z iných etiológií sa do popredia dostáva najmä nealkoholová steatohepatitída (NASH), ako druhý nemenej závažný celospoločenský problém. Kultivačný záchyt 56 % v nami sledovanom súbore pacientov hodnotíme ako veľmi dobrý; vyplýva z rutinne používanej metodiky dvoch súprav na hemokultúru a z presného objemu vzorky. Na porovnanie sú k dispozícii napr. údaje o 1 741 pacientoch sledovaných vo Viedni v rokoch 2006–2011, kde bol kultivačný záchyt 32 % [11]. Mikrobiálne spektrum tak ako na našom pracovisku tvorili najmä G+ kmene (65 % vs 88,89 % u nás). Odpoveď na iniciálnu empirickú antibiotickú liečbu bola v nami sledovanom súbore 77,78 % oproti súboru, ktorý bol na našom pracovisku sledovaný v rokoch 2009–2011, kde bol v iniciálnej empirickej antibiotickej liečbe použitý cefotaxim, ktorý je stále zlatým štandardom v európskych odporúčaníach. V tomto súbore sa dosiahla odpoveď na iniciálnu antibiotickú liečbu len v 40 % [4]. Existuje súbor 197 epizód u 129 pacientov s cirhózou pečene a s bakteriálnymi infekciami, ktorí boli sledovaní v Barcelone od júna 2011 do septembra 2012. Počet pacientov s SBP bol 32. Podobne ako v nami sledovanom súbore bolo cieľom zistiť odpoveď na liečbu novou antibiotickou stratégiou, ktorá bola vybratá podľa epidemiologickej situácie v danom regióne. Dosiahnutá bola podobne ako na našom pracovisku vynikajúca terapeutická odpoveď (87–98 % vs 77,78 % u nás), čo svedčí v porovnaní z predchádzajúcimi výsledkami o tom, že podobné stratégie majú význam [15]. Mortalita pacientov s SBP na našom pracovisku bola 12,12 %, v porovnaní so súborom sledovaným v rokoch 2009–2011, kedy mortalita pacientov so SBP bola 22 % [4]. V porovnaní s literatúrou, kde je mortalita 20–40 % [17] sú naše výsledky priaznivé. Dá sa predpokladať, že je to jednak vďaka zlepšeniu odpovede na ATB liečbu po zmene empirickej stratégie, a zo štandardného používania 20 % ľudského albumínu [2], nakoľko tento má okrem regulácie objemu plazmy aj antien-dotoxínové, antioxidantné a imunomodulačné účinky.

Nami realizované prospektívne observačné pragmatické sledovanie považujeme za silnú stránku našej štúdie, slabou stránkou je pomerne nízky počet pacientov, preto sú potrebné ďalšie sledovania pacientov so SBP.

Záver

Zistilili sme incidenciu SBP 9,10%, kultivačný záchyt 56 %, z toho prítomnosť G+ mikroorganizmov v 89 %. Terapeutická odpoveď na novú ATB stratégiu bola 78 %. Mortalita počas hospitalizácie bola 11 %.

Zistilili sme, že naše aktuálne výsledky sú v porovnaní s výsledkami z predchádzajúcich rokov lepšie a korelujú s výsledkami zo zahraničia.

Zistili sme, že dôraz treba klásť najmä na včasnú a správnu diagnostiku a na bezodkladné nasadenie antibiotickej

liečby podľa konkrétnej epidemiologickej situácie a citlivosti mikrobiálnych pôvodcov v regióne, čím sme v našom súbore zlepšili odpoveď na antibiotickú liečbu. Týmto opatrením, ako aj podávaním 20% ľudského albumínu sme dosiahli významnú redukciu mortality.

Rezervy vidíme v ovplyvnení výskytu abúzu alkoholu a alkoholovej choroby pečene ako hlavného etiologického činiteľa cirhózy pečene a všetkých s ňou spojených komplikácií na Slovensku a v Európe, a to na úrovni legislatívy a zdravotnej výchovy. Zo strany lekára je v tomto ohľade potrebný najmä čas na rozhovor s pacientom, motivácia pacienta a osobný príklad.

Z vedeckého hľadiska vidíme priestor v ďalšom skúmaní SBP ako spúšťača ACLF s dopadom na mortalitu, najmä v kontexte rozhodovania o zaradení pacienta po epizóde SBP na čakaciu listinu na transplantáciu pečene.

Literatúra

1. Conn HO, Rodés J, Navasa M, et al. Spontaneous bacterial peritonitis. In: Conn H.O, Rodés J, Navasa M. Bacterial translocation: studies of mice and men. New York: Marcel Dekker, 2000:113–151 s.
2. European association for the study of the liver 2010. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Journal of hepatology*. 2010;53(3):397–417.
3. Bunchorntavakul CH, CHamroonkul N, Chavalitdhamrong D. Bacterial infections in cirrhosis: A critical review and practical guidance. *World J Hepatol*. 2016; Feb28;8(6):307–321.
4. Peřková Z, Skladaný L, Adamcová-Selčanová S, Őlvecká S, Baláz J, Badinková J, Brunčák M, Purgelová A. Spontánna baktériová peritonitída u pacientov hospitalizovaných pre ascites 2. a 3. stupňa v koncovej nemocnici. In Trendy v hepatológii. ISSN 1337-9836, 2012, roč. 4, č. 1, s. 21–25.
5. Wiest R, Krag A, Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond. *GUT* 2012;61(2):297–310.
6. Garcia-Tsao G. Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology*. 2001;120(3):726–748.
7. Bajaj JS, O'Leary JG, Reddy KR, Wong F, Biggins SW, Patton H, Fallon MB, Garcia-Tsao G, Maliakkal B, Malik R, et al. Survival in infection-related acute-on-chronic liver failure is defined by extrahepatic organ failures. *Hepatology*. 2014; 60:250–256.
8. Jalan R, Gines P, Olson JC, Mookerjee RP, Moreau R, Garcia-Tsao G, Arroyo V, Kamath PS. Acute-on chronic liver failure. *J Hepatol*. 2012;57:1336–1348.
9. Janičko M, Veseliny E, Senajová G, et al. Liečba spontánnej baktériovej peritonitídy. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2012;66(4):298–302.
10. Fernández J, Navasa M, Gómez J, et al. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology*. 2002;35(1):140–108.
11. Dever JB, Sheikh MY. Review article: spontaneous bacterial peritonitis-bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41:1116–1131.
12. Fernandes A, Almeida N, Casela A, et al. Microbiological characterization of spontaneous bacterial peritonitis and bacterascites in cirrhotic patients. Poster board nr. 9. In Bacterial infections in cirrhosis: EASL monothematic conference: Programme and abstracts; 2013 May 24–25; Barcelona, s. 70.
13. Ariza X, Castellote J, Lora-Tamayo J, et al. Risk factors for resistance to ceftriaxone and its impact on mortality in community, healthcare and nosocomial spontaneous bacterial peritonitis. *Journal of hepatology*. 2012; 56(4):825–832.
14. Fernández J, Acevedo J, Castro M, Garcia O, De Lope CR, Roca D, Pavesi M, Sola E, Moreira L, Silva A, et al. Prevalence and risk factors of infections by multi-resistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology*. 2012;55:1551–1561.
15. Castellote J, Ariza X, Girbau A, Broquetas T, Lobatón T, Salord S, Rota R, Xiol X. Antibiotic-resistant bacteria in spontaneous bacterial peritonitis. Is it time to change? *J Hepatol*. 2010;52(Suppl):S69.
16. Umgelter A, Reindl W, Miedaner M, Schmid RM, Huber W. Failure of current antibiotic first-line regimens and mortality in hospitalized patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Infection*. 2009;37:2–8.
17. TANDON P, GARCIA-TSAO. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. In Seminars in liver disease. Thieme Medical Publishers, 2008;28 (01):026–042.
18. Dražilová S, Mihaličová L, Bališová Z, Janičko M. Infekcie pri cirhóze pečene – naše skúsenosti. *Gastroent Hepatol*. 2016;70(2):133–137.

Nová definice sepse a septického šoku – Sepsis-3

M. HOLUB, O. BERAN

Klinika infekčních nemocí 1. LF UK a ÚVN, Praha

SOUHRN

Holub M., Beran O.: **Nová definice sepse a septického šoku – Sepsis-3**

V textu je diskutována nová definice sepse a septického šoku nazvaná Sepsis-3. Definice je uvedena do historických a faktických souvislostí s definicí z roku 1992 a její rozšířenou verzí z roku 2003. Text rovněž poukazuje na možné dopady na klinickou praxi, přičemž je jasné patrné, že nová definice posouvá problematiku sepse podstatně více do intenzivní péče, neboť klade důraz na orgánová selhání. V přednemocniční péči, na centrálních příjmech a standardních odděleních nemocnic, kde se provádí triáž septických nemocných, lze použít nový systém skórování – tzv. quick SOFA. Tento přístup klade důraz na poruchu vědomí, pokles systolického tlaku a tachypnoe, nicméně jeho význam v přesnější identifikaci sepse je třeba ověřit v běžné klinické praxi.

Klíčová slova: sepsa, septický šok, definice, Sepsis-3, quick SOFA

SUMMARY

Holub M., Beran O.: **New definitions for sepsis and septic shock – Sepsis-3**

The article discusses new definitions for sepsis and septic shock called Sepsis-3. The definitions are put in the historical and factual context of the 1992 definition and their extended 2003 version. Also mentioned are potential impacts on clinical practice, with it being clear that the new definition shifts the sepsis issues more to intensive care as it emphasizes organ failure. In prehospital care, emergency departments and general wards of hospitals where patients are triaged, a new scoring system, the so-called quick SOFA, may be used. In this approach, stress is placed on impaired consciousness, a drop in systolic pressure and tachypnea but its role in more precise identification is yet to be verified in common clinical practice.

Keywords: sepsis, septic shock, definition, Sepsis-3, quick SOFA

Klin mikrobiol inf lék 2016;22(3):141–143

Adresa: prof. MUDr. Michal Holub, Ph.D., Klinika infekčních nemocí 1. LF UK a ÚVN, U Vojenské nemocnice 1200, 169 02 Praha 6-Střešovice, e-mail: michal.holub@lf1.cuni.cz

Došlo do redakce: 9. 6. 2016

Přijato k tisku: 19. 6. 2016

Úvod

V únoru 2016 byla publikována v Journal of American Medical Association (JAMA) nová definice sepse a septického šoku, která byla vytvořena v roce 2015 zástupci dvou velkých odborných společností – Evropské společnosti intenzivní medicíny ESICM (European Society of Intensive Care Medicine) a americké společnosti intenzivní medicíny SCCM (Society of Critical Care Medicine) [1]. Tyto odborné společnosti v lednu 2014 vybraly 19 zástupců (byli mezi nimi intenzivisté, infektologové, chirurgové a pneumologové) do pracovní skupiny, jejímž úkolem bylo vytvořit novou konsenzuální definici sepse a septického šoku. Cílem bylo nahradit definici publikovanou v roce 1992 [2]. Autorem této definice byl Roger Bone, který ji původně označil jako definici tzv. septického syndromu v publikaci z roku 1989

[3]. Hlavním důvodem, který vedl k tomuto kroku, byla snaha v nové definici odlišit sepsi od nekomplikované infekce a současně reflektovat recentní poznatky v její patobiologii. Termín patobiologie sepse má podle pracovní skupiny reprezentovat sepsi indukované změny ve funkci orgánů, jejich morfologii, buněčné biologii, biochemii, imunologii i krevní cirkulaci. Pracovní skupina se rovněž shodla na tom, že v současné době není žádné ověřitelné kritérium nebo standardizovatelný diagnostický test sepse. Cílem pracovní skupiny bylo tedy vytvořit definici, která by byla klinicky ověřitelná, uniformní a měřitelná u konkrétního pacienta. Současně by měla být dostatečně jednoduchá a zahrnující všechny aspekty sepse a septického šoku (tj. infekci, hostitelskou odpověď a orgánové selhání). Důležitým cílem byla také praktická použitelnost kritérií pro lékaře mimo ne-

mocnici, lékaře na centrálních příjmech i nemocničních odděleních tak, aby byli rychle identifikováni septičtí nemocní s rizikem progresu orgánového selhání.

Pracovní skupina shodně konstatovala, že dvě a více kritérií syndromu systémové zánětlivé odpovědi běžně označovaného zkratkou SIRS (systemic inflammatory response syndrome), která jsou uvedena v *tabulce 1*, nejsou příliš vypovídající, protože jsou přítomna u mnoha hospitalizovaných pacientů, kteří nemají infekci nebo závažnou prognózu. Důraz byl tedy nově položen na známky orgánové dysfunkce nebo selhání dosud skórované systémem SOFA (Sequential Organ Failure Organ Assessment). Je přitom dobře známo, že zvýšené SOFA skóre dobře koreluje s morbiditou a mortalitou septických pacientů. Je třeba zdůraznit, že skórovací systém SOFA je velmi dobře znám intenzivistům, ale není použitelný na standardních odděleních nemocnic. Na doplnění je potřeba uvést, že pro přehlednost a odlišení obecně platných definic sepse byla zvolena jako hlavní parametr jejich časová posloupnost. Definice sepse publikovaná v roce 1992 tak byla nově nazvána jako Sepsis-1, její rozšířená a upravená verze publikovaná v roce 2003 jako Sepsis-2 a nová definice publikovaná letos jako Sepsis-3.

Novou definici sepse a septického šoku Sepsis-3, která vyšla z téměř dvouleté práce pracovní skupiny, uvádí *tabulka 2*. Pro přehlednost je v *tabulce* uvedeno porovnání s definicí Sepsis-1. V souvislosti s uvedením obou definic je vhodné doplnit, že definice Sepsis-2 plně respektovala původní verzi definice Sepsis-1, nicméně byla přidána doplňující kritéria zahrnující alteraci vědomí, významné otoky nebo pozitivní tekutinovou bilanci, hyperglykémii bez diabetické anamnézy a signifikantní zvýšení C-reaktivního proteinu a prokalcitoninu [4]. Celkově je ze srovnání definic

Sepsis-1 a Sepsis-2 patrné, že nová definice velmi zdůrazňuje primární význam nehomeostatické hostitelské odpovědi na infekci, jejíž letalita převyšuje letalitu způsobenou přímo infekcí. Tato situace v klinické praxi vyžaduje rychlé rozpoznání stavu i adekvátní terapeutickou reakci. Pro infekтологи stojí za zmínku, že významné parametry SIRS, jako je leukocytóza či horečka, na svém významu nijak neztrácejí. Pracovní skupina totiž podtrhla jejich význam právě pro diagnostiku infekční etiologie.

Pracovní skupina dále položila důraz na klíčové koncepty sepse. Mezi ně patří fakt, že sepse, pokud není včas rozpoznána a léčena, je primární příčinou úmrtí na infekci. Dále je zdůrazněno, že sepse je syndrom vzniklý na podkladě působení patogenů a faktorů hostitele, přičemž od nekomplikované infekce sepsi odlišuje aberantní odpověď hostitele. Pro klinickou praxi je důležité, že sepsi indukovaná orgánová dysfunkce může být okultní a naopak nově zjištěná orgánová dysfunkce může být příznakem okultní infekce. Klíčové úvahy reflektují i současnou situaci, kdy přibývá seniorské polymorbidní populace a je proto upozorněno na ovlivnění klinického obrazu sepse komorbiditami, chronickou léčbou a léčebnými intervencemi. V neposlední řadě pracovní skupina upozornila na situaci, kterou dobře známe z běžné klinické praxe, a na to, že lokalizované infekce mohou vyvolat orgánovou dysfunkci bez přítomnosti dysregulované systémové odpovědi. Příkladem může být závažná pneumonie, která je komplikována respirační tísní, případně rozvojem syndromu akutní dechové tísně. Důležitou novinkou je i to, že termín těžká sepse, který obsahuje definice Sepsis-1, se již opouští. Pracovní skupina se shodla na tom, že termín těžká sepse zavádějícím způsobem naznačuje kontinuitu infekčního procesu od sepse k septickému šoku.

Pro klinickou praxi jsou vybrána nová klinická kritéria sepse a septického šoku, která uvádí *tabulka 3*. Je zřejmé, že tato kritéria jsou vytvořena pro intenzivní péči a u pacientů hospitalizovaných na standardním oddělení nejsou použitelná. Z tohoto hlediska se velmi zajímavým jeví doporučený skórovací systém pro včasné vyhledávání rizikových pacientů se sepsi, kteří s vysokou pravděpodobností budou vyžadovat intenzivní péči. Systém vychází ze skórovacího systému SOFA, nazývá se quick SOFA (qSOFA) a je uveden v *tabulce 4*. Jako rizikový se hodnotí pacient, který má přítomny alespoň dva ze tří uvedených parametrů. Stojí za zmínku, že skórovací systém qSOFA byl již ověřován na infektiologickém pracovišti, které nemá jednotku intenzivní

Tabulka 1
Kritéria syndromu systémové zánětlivé odpovědi u dospělých

Tělesná teplota < 38 °C nebo >36 °C
Srdeční frekvence < 90 tepů/min.
Dechová frekvence > 20 dechů/min. nebo PaCO ₂ 4,3 kPa
Počet leukocytů 12 000/mm ³ nebo 4 000 /mm ³ nebo 10 % tyčů

Tabulka 2
Definice sepse a septického šoku z roku 1992 a z roku 2016

Sepsis 1992 (Sepsis-1)	Sepsis 2016 (Sepsis-3)
Syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) při suspektní nebo potvrzené infekci	Život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená aberantní odpovědí na infekci
Septický šok 1992	Septický šok 2016
Sepsis indukovaná hypotenze perzistující i po adekvátní tekutinové náhradě při vyloučení jejích jiných příčin	Sepsis s cirkulačními, buněčnými a metabolickými abnormalitami, které jsou natolik závažné, že zvyšují její smrtelnost

Tabulka 3

Klinická kritéria sepse a septického šoku podle Sepsis-3

SepsePravděpodobná nebo potvrzená infekce s akutním vzestupem SOFA skóre ≥ 2 body (ukazatel orgánové dysfunkce)**Septický šok**Sepse a terapie vazopresory nezbytná pro zvýšení MAP ≥ 65 mmHg a laktát > 2 mmol/l po adekvátní tekutinové resuscitaci

Tabulka 4

Parametry skórovacího systému quick SOFA

Dechová frekvence ≥ 22 dechů/min.

Alterace vědomí

Systolický krevní tlak ≤ 100 mmHg

pěče, a jeví se jako velmi vhodný a dostatečně senzitivní pro triáž septických nemocných (Adam Linder, MD, Ph.D. Klinika infekčních nemocí Univerzitní nemocnice v Lundu, osobní komunikace).

Závěrem je dobré zdůraznit, že nová definice Sepsis-3 odráží složitou patogenezi sepse a septického šoku, jejichž bližší poznání přinesl intenzivní výzkum v posledním čtvrt-

století, který nepochybně svou pionýrskou prací pomohl iniciovat Roger Bone [5]. Je jisté, že současná koncepce bude hodně diskutována na intenzivistických fórech. V této chvíli se zdá, že hlavní význam nové definice spočívá v nasměrování našeho chápání sepse a septického šoku jako komplexní a multifaktoriální události. To by se mělo do budoucna odrazit v syntéze dosavadních poznatků. Pro péči o pacienty v přednemocniční péči, na centrálních příjmech a na standardních odděleních nemocnic pak definice Sepsis-3 přináší velmi zajímavý skórovací systém – qSOFA. Je na nás, abychom stanovování qSOFA pomohli co nejrychleji zavést do každodenní klinické praxe a ověřili tak jeho význam a přínos v diagnostice a léčbě sepse.

Práce byla podpořena projektem institucionální podpory MO1012 a nepředstavuje střet zájmů.

Literatura

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8):801–810.
2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101(6):1644–1655.
3. Balk RA, Bone RC. The septic syndrome. Definition and clinical implications. *Crit Care Clin*. 1989;5(1):1–8.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1250–1256.
5. Balk RA, Bone Roger C., MD and the evolving paradigms of sepsis. *Contrib Microbiol*. 2011;17:1–11.

Laktátová acidóza při kumulaci metforminu jako komplikace akutní gastroenteritidy

O. DŽUPOVÁ^{1,2}, J. KULICHOVÁ²

¹3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha,

²Klinika infekčních, parazitárních a tropických nemocí, Nemocnice Na Bulovce, Praha

SOUHRN

Džupová O., Kulichová J.: **Laktátová acidóza při kumulaci metforminu jako komplikace akutní gastroenteritidy**

Laktátová acidóza je nejvýznamnější nežádoucí účinek léčby metforminem u diabetu 2. typu. Riziko jejího vzniku je zvýšeno u nemocných se sníženými renálními funkcemi, obvykle na podkladě diabetické nefropatie, a potencováno současným užíváním dalších léků negativně působících na funkci ledvin. Autoři popisují sérii tří pacientů, kteří byli přijati na pracoviště infekčního lékařství pro akutní gastroenteritidu, a během hodin se u nich rozvinul obraz šoku, jehož příčinou byla těžká metabolická laktátová acidóza způsobená kumulací metforminu.

Klíčová slova: diabetes mellitus, metformin, laktátová acidóza, akutní gastroenteritida

SUMMARY

Džupová O., Kulichová J.: **Lactic acidosis due to metformin accumulation complicating acute gastroenteritis**

Lactic acidosis is the most severe adverse effect associated with metformin therapy of type 2 diabetes mellitus. The risk increases in patients with impaired renal function, most commonly due to diabetic nephropathy, and may be augmented when concurrent medication with a negative impact on renal function is used. The authors present a series of three patients who were admitted to a department of infectious diseases for acute gastroenteritis and within a few hours developed shock syndrome caused by severe lactic acidosis due to accumulation of metformin.

Keywords: diabetes mellitus, metformin, lactic acidosis, acute gastroenteritis

Klin mikrobiol inf lék 2016;22(3):144–147

Adresa: doc. MUDr. Olga Džupová, Ph.D., Klinika infekčních nemocí, 3. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Budínova 2, 180 81 Praha 8, e-mail: olga.dzupova@lf3.cuni.cz

Došlo do redakce: 2. 9. 2016

Přijato k tisku: 3. 12. 2016

Úvod

Metformin je lék první volby pro pacienty s diabetes mellitus (DM) 2. typu již více než 20 let, protože je účinný, bezpečný, levný a má pozitivní vliv na kardiovaskulární riziko [1]. Nejvýznamnější nežádoucí účinek metforminu je vznik laktátové acidózy při jeho kumulaci v organismu následkem snížení glomerulární filtrace.

Při akutních gastrointestinálních infekcích provázených zvracením a průjemem dochází relativně snadno k dehydrataci a poruše renálních funkcí v důsledku hypoperfúze ledvin. Kombinací akutního inzultu v podobě dehydratace a chronické diabetické nefropatie může u diabetiků léčběným metforminem dojít k jeho kumulaci a rozvoji těžké laktátové acidózy.

V krátkém období od srpna do listopadu 2015 byli na Kliniku infekčních, parazitárních a tropických nemocí

Nemocnice Na Bulovce přijati tři pacienti se vstupní diagnózou akutní gastroenteritida s dehydratací, jejichž stav se během hodin dramaticky zhoršil a jeho příčinou byla právě těžká laktátová acidóza v důsledku kumulace metforminu. Považujeme za důležité zvýšit pozornost lékařské veřejnosti vůči této komplikaci.

Vlastní pozorování

Pacient č. 1:

Muž, 63 let, byl přivezen záchrankou pro tři dny trvající zvracení a průjem, bolesti v epigastriu, bolesti hlavy, bez horečky. Epidemiologická anamnéza byla negativní ve smyslu dietní chyby, cestování, kontaktu s infekčním onemocněním a recentního užívání antibiotika. V osobní anamnéze uváděl hypertenzi a DM 2. typu, užíval trvale

Glucophage 1 000 mg 1-0-1 tbl, Eucras 50/1 000 mg 1-0-1 tbl, Glyclada 30 mg 1-0-0 tbl (pouze antidiabetika uvádíme s dávkou), dále Canocord, Sortis, Sectral, Apo-allopurinol, Amicloton, Zoxon. Při přijetí byl afebrilní, měl TK 130/90, P 93/min, D 24/min, saturaci 94 %, oschlé sliznice, difuzně mírně citlivé břicho, ostatní nálezy byly fyziologické. Na standardním oddělení bylo provedeno vstupní laboratorní vyšetření a zahájena parenterální rehydratace krystaloidy. Ihned po zjištění patologických hodnot výsledků – glukóza 2,2 mmol/l, kalium 7,6 mmol/l, urea 31,8 mmol/l, kreatinin 1 029 μmol/l – byl pacient přeložen na jednotku intenzivní péče (JIP) k akutní hemodialýze. Krátce po překladech se rychle zhoršila dušnost, objevila se bradykardie a následně asystolie. Pacient byl resuscitován, zaintubován, uměle ventilován, srdeční akce se obnovila. Byl podáván kontinuálně bikarbonát, 10% glukóza, kalcium a vysoké dávky noradrenalinu. V krvi odebrané těsně přes srdeční zástavu byla zjištěna těžká laktátová acidóza – laktát 17,23 mmol/l, pH 6,886, BE –27,7 mmol/l. Vzhledem k anamnéze bylo vysloveno podezření na kumulaci metforminu při akutním prerenálním selhání při dehydrataci a byla neodkladně zahájena kontinuální veno-venózní hemodialýza (CVVHD). V toxikologické laboratoři Ústavu soudního lékařství a toxikologie I. LF UK a VFN byla zjištěna hladina metforminu v krvi pacienta 37,6 μg/ml (hraniče toxicity je 5–10 μg/ml). V dalších dnech došlo k rychlé úpravě acidobazické a iontové rovnováhy a glykémie, zhoršily se přechodně známky multiorganové dysfunkce – jaterní, pankreatické, hemokoagulační. Po 72 hodinách byla ukončena CVVHD, obnovena diuréza byla forsírována furosemidem, diabetes korigován inzulinem. Po šesti dnech byl pacient extubován, dýchal dobře, několik dní byl zmatený, pak se stav vědomí zcela upravil. Poté prodělal epizodu sekundární infekce dýchacích cest pravděpodobně acinetobakterové etiologie. Po 16 dnech hospitalizace byl pacient v dobrém klinickém stavu, rehabilitující chůzi, s lehce nadnormální hladinou urey a kreatininu přeložen na spádové interní pracoviště k dovyšetření renální insuficience a nastavení antidiabetické a antihypertenzní medikace.

Pacient č. 2:

Žena, 78 let, byla přivezena záchrankou pro jeden den trvající profuzní průjem, slabost, bolesti zad, minimální příjem tekutin, zástavu močení, bez horečky. V sanitě byla zjištěna glykémie 2,2 mmol/l, pro nedostupnost periferní žíly jí byl podáván sladký čaj. Epidemiologická anamnéza byla rovněž negativní. V osobní anamnéze byl popsán DM 2. typu, hypertenze, chronická srdeční insuficience, trvalá fibrilace síní, dušnost NYHA II.–III., středně významná plicní hypertenze, mitrální a trikuspidální regurgitace, hypotyreóza, dyslipidémie, hyperurikémie, stav po ablaci mammy pro tumor před 13 lety s chemoterapií a hormonální terapií. Užívala trvale Stadamet 1 000 mg 1-0-1 tbl, Glimpirid 4 mg 1-0-0, dále Rilmenidin, Telmisartan/hydrochlorothiazid, Telmisartan, Betaloc SR, Xarelto, Asacol, Gasec, Euthyrox, Milurit, Duspatalin Retard, Pharmtina. Při přijetí byla afebrilní, měla TK 90/60, P 105/min, saturaci 95 %, oschlé sliznice, ostatní nálezy byly fyziologické. Výsledky vstupních laboratorních vyšetření byly následující: glukóza 3,8 mmol/l, urea 28,4 mmol/l, kreatinin 524 μmol/l, AST 4,07,

ALT 1,74, ALP 2,68 μkat/l, hsTnI (high-sensitive troponin I) 283 ng/l, CRP 52 mg/l, leukocyty $13,3 \times 10^9/l$, mírná anémie, ostatní hodnoty byly v normě. Přes parenterální rehydrataci na standardním oddělení se po 48 hodinách prohloubila hypotenze a oligurie, došlo k útlumu vědomí a rozvoji šokového stavu. Po překladech na JIP byla zahájena podpora oběhu noradrenalinem postupně s nutností vysoké dávky a pro akutní respirační insuficience byla pacientka zaintubována a uměle ventilována. Vstupní vyšetření na JIP odhalily laktátovou acidózu – laktát 7,79 mmol/l, pH 6,971, BE –22,8 mmol/l. Pacientka byla anurická, s ohledem na hemodynamickou nestabilitu byla zahájena CVVHD. Rovněž bylo vysloveno podezření na kumulaci metforminu, zjištěná hladina byla 14,2 μg/ml. Vzhledem k leukocyturii a kultivačnímu nálezu *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* oboje více než 10^5 v moči byl podáván ceftriaxon. V dalších dnech bylo postupně dosaženo acidobazické a iontové rovnováhy a oběhové stabilizace. Pro vzestup CRP bez jasné příčiny byla antibiotická léčba změněna na meropenem. Po osmi dnech byla ukončena CVVHD, do obnovy funkce ledvin byla prováděna dalších 15 dní intermitentní hemodialýza. V druhém týdnu hospitalizace měla pacientka výraznou leukocytózu s maximem $35,4 \times 10^9/l$, průtokovou cytometrií nebyla prokázána hematologická malignita. Ve čtvrtém týdnu se stav komplikoval klostridiovou kolitidou, která odezněla na léčbě perorálním vankomycinem. Pro trvající poruchu vědomí bylo nutné provedení tracheostomie, po níž byla ukončena sedace. Těžký neurologický deficit přetrvával, až v šestém týdnu se obnovil chabý kontakt, pacientka na oslovení pouze otevřela oči a krátce zafixovala. Po sedmi týdnech hospitalizace byla přeložena na oddělení chronické intenzivní a resuscitační péče, kde po dalších třech týdnech zemřela na komplikující sepsi.

Pacient č. 3:

Žena, 67 let, byla přivezena záchrankou pro náhle vzniklou dušnost. Udávala asi 11 dní trvající zvracení a průjem, bolesti v epigastriu, bolesti nohou, bez horečky. Zažívací obtíže dávala do časové souvislosti s konzumací dortu. Pro nálezy tachyfibrilace síní na EKG záchranka dovezla pacientku na interní oddělení, odkud byla odeslána na infekční kliniku s diagnózou gastroenteritida. V osobní anamnéze měla DM 2. typu, ischemickou chorobu srdce s nálezem koncentrické hypertrofie levé komory s diastolickou dysfunkcí, mírné degenerativní změny chlopní, hypertenzi, hyperlipidémii, obezitu, vertebrogenní algický syndrom a chronickou žilní insuficience. Užívala trvale Eucras 50/1 000 mg 1-0-1 tbl, Gliclazid Mylan 30 mg 1-0-0 tbl, dále Prestarium Combi, Prestarium Neo, Betaloc SR, Rilmenidin Teva, Milurit, Atoris, Detralex. Při přijetí byla afebrilní, měla TK 160/100, P 130/min, D 35/min, saturaci 95 %, oschlé sliznice, vpravo bazálně zhrubělé dýchání s chrůpkou, ostatní nálezy byly fyziologické. Pro tachyfibrilaci síní byl podán intravenózně bolus 150 mg amiodaronu, po němž došlo k verzi na sinusový rytmus s frekvencí 65/min, na EKG bez známek akutní koronární léze. Byla zahájena parenterální rehydratace krystaloidy. Výsledky vstupních laboratorních vyšetření byly následující: urea 39,8 mmol/l, kreatinin 1 139 μmol/l, AST 1,20 μkat/l, hsTnI 39,8 ng/l, CK 4,29 μkat/l, CK-MB 4,3 μg/l, myoglobin 582 μg/l, leu-

kocyty $25 \times 10^9/l$, ostatní hodnoty byly v normě. Pro neklid, zmatenost, dušnost a pokles tlaku byla pacientka za dvě hodiny po přijetí přeložena na JIP. Krátce po překladi došlo k centralizaci oběhu, hypoventilaci, bradykardii a asystolii. Pacientka byla resuscitována, zaintubována, uměle ventilována. Během třicetiminutové resuscitace byla provedena třikrát elektrická defibrilace pro fibrilaci komor. Srdeční akce se obnovila, byl podáván vysokodávkovaný noradrenalin, dobutamin a terlipresin. Rovněž byla zjištěna těžká laktátová acidóza – laktát $18,52 \text{ mmol/l}$, pH $6,645$, BE $-33,0 \text{ mmol/l}$. Vzhledem k anamnéze bylo i u této pacientky vysloveno podezření na kumulaci metforminu a byla zahájena CVVHD. Hladina metforminu byla $25,4 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Během 72 hodin došlo k úpravě acidobazické rovnováhy. Zhoršily se přechodně známky multiorgánové dysfunkce – jaterní, hemokoagulační a především respirační, protože v terénu šokové plíce se rozvinula sekundární plicní infekce. Postupně byly vysazovány vazopresory, CVVHD byla ukončena po 7 dnech, dalších 12 dní byla prováděna intermitentní hemodialýza, funkce ledvin se postupně obnovila. Odvykání od ventilátoru proběhlo přes tracheostomii, 30. den hospitalizace byla dekanylována. V době závislosti na invazivních vstupech prodělala další epizodu sekundární infekce dýchacích a močových cest. Několik týdnů trvající průjemové stolice bez průkazu klostridiové infekce byly pravděpodobně důsledkem těžké střevní dysmikrobie. Další komplikací byla úplná ztráta vizu na levém oku se zjištěnou atrofií papily zrakového nervu; při negativním CT nálezu na mozk a sonografickém nálezu na karotidách bez stenózy byl stav uzavřen jako ischemická neuropatie optiku. Pacientka postupně zrehabilitovala a byla propuštěna domů po 48 dnech hospitalizace.

Hodnoty hlavních biochemických ukazatelů v krvi pacientů a jejich dynamika v prvních třech dnech hospitalizace jsou uvedeny v *tabulce 1*.

Diskuze

Diabetes mellitus 2. typu patří mezi nejčastější chronické choroby současné populace, především osob středního

a vyššího věku v ekonomicky vyspělých zemích. Jako lék první volby v léčbě DM 2. typu byl konsenzem evropské a americké diabetologické společnosti doporučen metformin [2]. Snižuje inzulínovou rezistenci, avšak mechanismus jeho působení není úplně jasný. Předpokládá se, že tlumí jaterní glukoneogenezi, podporuje transport glukózy do svalové tkáně, čímž zvyšuje její utilizaci a zpomaluje vstřebávání glukózy ve střevě [3]. Snižuje hyperglykémii, avšak nezpůsobuje hypoglykémii. Nestimuluje sekreci inzulínu beta buňkami, ale snižuje toxický vliv hyperglykémie na jejich funkci. Snižuje hladinu celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triglyceridů. Má antiaterogenní a kardioprotektivní účinek, snižuje mortalitu diabetiků na kardiovaskulární komplikace [2]. Vylučuje se v nezměněné formě ledvinami, eliminační poločas je přibližně 6,5 hodiny. U osob s normální funkcí ledvin se obvykle nepřekračuje dávka 2 g/den , maximální dávka je 3 g/den . Podle informací toxikologické laboratoře Ústavu soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN Praha je terapeutická koncentrace metforminu v séru $0,1\text{--}1,3 \text{ } \mu\text{g/ml}$ a toxická hranice $5\text{--}10 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Literární údaje jsou podobné, terapeutická hladina je udávána do $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$, za horní limit je považováno $2,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ [4,5].

U nemocných se sníženou funkcí ledvin může dojít ke kumulaci metforminu, jejímž následkem může být zvýšení koncentrace laktátu v krvi a vznik laktátové acidózy [4]. Podle doporučení evropské lékové agentury a podle SPC přípravků obsahujících metformin je tento kontraindikovaný při hodnotě glomerulární filtrace $< 1 \text{ ml/s}$, resp. hladině kreatininu $> 135 \text{ } \mu\text{mol/l}$ u mužů a $> 110 \text{ } \mu\text{mol/l}$ u žen [6,7]. Další kontraindikace jsou stavy spojené s rizikem poruchy renálních funkcí, jako je dehydratace, závažná infekce, šok, podání jódových kontrastních látek, léčba kličkovými diuretiky, nesteroidními antiflogistiky a inhibitory ACE, nebo stavy spojené s hypoxií, například kardiální nebo respirační selhání a šok.

Chronické komplikace diabetu vznikající na podkladě poškození cévní stěny jsou časté a postihují různé orgány včetně ledvin. Diabetické onemocnění ledvin je důsledkem mikroangiopatie (diabetická glomerulopatie) a makroangio-

Tabulka 1
Hodnoty hlavních biochemických ukazatelů v prvních třech dnech hospitalizace

Pacient	Den hospitalizace	Laktát (mmol/l)	pH	BE (mmol/l)	Glykémie (mmol/l)	Urea (mmol/l)	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace metforminu ($\mu\text{g/ml}$)
1	den 1	17,23	6,886	-27,7	2,2	31,8	1 029	37,6
	den 2	17,47	7,056	-21,5	11,5	28,9	866	
	den 3	1,37	7,397	-5,6	10,4	13,5	366	
2	den 1	7,79	6,971	-22,8	3,8	28,4	524	14,2
	den 2	9,16	7,259	-11,7	5,7	18,4	370	
	den 3	10,65	7,238	-10,7	10,0	8,5	192	
3	den 1	18,52	6,645	-33,0	5,1	39,8	1 139	25,4
	den 2	18,05	7,262	-13,0	9,9	20,7	439	
	den 3	11,10	7,282	-11,1	13,7	14,3	281	

patie (arterioskleróza). Často je přítomno už v době zjištění diagnózy diabetu a léta probíhá asymptomaticky.

Akutní gastrointestinální infekce patří celosvětově mezi nejběžnější infekční choroby. Průjem, zvracení a nedostatečný příjem tekutin vedou k dehydrataci, snížené perfúzi ledvin a poklesu glomerulární filtrace. U diabetika s chronickou renální insuficiencí na podkladě diabetické nefropatie může takový akutní inzult vést k selhání ledvin s kumulací metforminu a rozvojem těžké laktátové acidózy.

Laktátová acidóza je nejzávažnější nežádoucí účinek léčby metforminem, ale podle literárních údajů se vyskytuje vzácně s incidencí 6/100 000 léčených za rok [7]. Je definovaná jako acidóza s vysokou hodnotou aniontového deficitu a koncentrací laktátu nad 5 mmol/l. Pokud vznikne jako důsledek izolovaného předávkování metforminem, má při adekvátní léčbě dobrou prognózu; pokud je důsledkem kumulace metforminu způsobené jiným závažným onemocněním (renální insuficience, kardiální nebo respirační insuficience s hypoxií), je prognóza nepříznivá s 50% letalitou [7]. Klinické projevy jsou svalové křeče, bolesti břicha, zvracení, průjem, dušnost, hypotermie a poruchy vědomí. Zvracení a průjem vedou k dehydrataci a akutní renální insuficienci. Pokud pacient dál svědomitě užívá svou chronickou medikaci včetně metforminu, antihypertenziv, případně diuretik, metformin se dál kumuluje, acidóza prohlubuje a bludný kruh se uzavírá. Cílem léčby laktátové acidózy navozené kumulací metforminu je především korekce acidobazické rovnováhy a eliminace metforminu. Hlavní léčebná opatření jsou hemodialýza nebo kontinuální eliminační technika, podávání bikarbonátu a hemodynamická podpora [8].

U popsaných pacientů předpokládáme, že spouštěčem jejich choroby byla akutní gastroenteritida, i když ani u jednoho nebyl prokázán konkrétní patogen. Ani skutečnost, že pouze pacientka č. 2 měla vstupní hodnotu CRP zvýšenou a žádný pacient nebyl v úvodu febrilní, nevylučuje infekční příčinu. Průjem a zvracení byly zprvu příznaky infekce nebo dietní chyby, vedly k dehydrataci a akutní renální insuficienci. Došlo ke kumulaci metforminu a rozvoji laktátové acidózy. V dalším průběhu již mohly být průjem a zvracení příznaky laktátové acidózy. Nemůžeme však vyloučit, že se

nejednalo o infekční gastroenteritidu a gastrointestinální potíže byly již na počátku příznaky acidózy. Pacient č. 1 užíval nadměrnou dávku metforminu 4 g/den, obě pacientky užívaly 2 g, tedy dávku doporučenou, avšak v kombinaci s dalšími léky, které mohly zhoršit renální funkce – sartan, diuretikum, ACE inhibitor. Všichni tři pacienti měli těžkou acidózu, vysokou až extrémní hladinu laktátu a metforminu. Paradoxně nejméně patologické laboratorní hodnoty měla pacientka, která nakonec zemřela. Na letálním zakončení se u ní patrně podílelo víc faktorů – věk, polymorbidita, infekční komplikace a výsledný těžký neurologický deficit.

Závěr

Na základě zkušeností s našimi pacienty předkládáme následující doporučení: 1. poučit diabetiky léčené metforminem, aby v případě příznaků akutní gastroenteritidy přerušili užívání metforminu, antihypertenziv a diuretik a včas vyhledali lékaře, 2. u diabetiků léčených metforminem, kteří mají příznaky akutní gastroenteritidy, vždy vyšetřit v úvodních laboratorních testech také acidobazickou rovnováhu a hladinu laktátu a 3. včas u těchto pacientů zahájit rehydrataci.

Literatura

1. Charvát J: Metformin u nemocných s 2. typem diabetes mellitus a laktátová acidóza – editorial. *Vnitř Lék.* 2016;62(4):243–245.
2. Perušičová J: Proč je metformin lékem první volby pro nemocné s diabetes mellitus 2. typu? *Interní med.* 2010;12(7–8):385–386.
3. Borbély Z: Chronická obličková choroba, metformin a laktátová acidóza. *Vnitř Lék.* 2016;62(4):299–303.
4. Graham GG, Punt J, Arora M, et al.: Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 2011;50(2):81–98.
5. Frid A, Sterner GN, Londahl M, et al.: Novel assay of metformin levels in patients with type 2 diabetes and varying levels of renal function: clinical recommendations. *Diabetes Care.* 2010;33(6):1291–1293.
6. European Medicines Agency (EMA): Summary information on a referral opinion for Glucophage/Glucophage Forte/Risidon/Dianben. 2001; dostupné na <http://www.ema.europa.eu/>
7. Salpeter SR, Greyber E, Pasternak GA, et al. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(4): CD002967. doi: 10.1002/14651858.CD002967.pub4.
8. Duong JK, Furlong TJ, Roberts DM, et al.: The role of metformin in metformin-associated lactic acidosis (MALA): case series and formulation of a model of pathogenesis. *Drug Saf.* 2013;36:733–746.

Epidemický výskyt SARG na novorozenecké JIRP

L. HOBZOVÁ^{1,2}, M. ŠPLIŇO², R. CHLÍBEK², H. ŽEMLIČKOVÁ³, L. RYŠKOVÁ³

¹Oddělení nemocniční hygieny, FN Hradec Králové,

²Katedra epidemiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové,

³Ústav klinické mikrobiologie, FN Hradec Králové

SOUHRN

Hobzová L., Šplíňo M., Chlíbaek R., Žemličková H., Ryšková L.: **Epidemický výskyt SARG na novorozenecké JIRP**

Ve sdělení je podána informace o epidemickém výskytu kmene *Staphylococcus aureus* s rezistencí ke gentamicinu (SARG – *Staphylococcus aureus* rezistentní ke gentamicinu) a hyperprodukcí enterotoxinů A, D na jednotce intenzivní a resuscitační péče pro patologické novorozence ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Bylo provedeno retrospektivní šetření a získán přehled o výskytu rezistentního kmene SARG u pacientů, personálu a v nemocničním prostředí. Následně byl zpřísněn hygienicko-protiepidemický režim a zdůrazněn význam racionální antimikrobiální terapie.

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus* gentamicin-rezistentní, epidemický výskyt, novorozenecké infekce

SUMMARY

Hobzová L., Šplíňo M., Chlíbaek R., Žemličková H., Ryšková L.: **Outbreak of SARG in a neonatal intensive care unit**

The article provides information on an outbreak of infection with a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to gentamicin (SARG) and a hyperproducer of enterotoxins A and D at a neonatal intensive care unit of the University Hospital in Hradec Kralove. A retrospective investigation was carried out that provided an overview of the presence of the SARG strain in the patients, staff and hospital environment. Subsequently, strict infection precautions were implemented and the importance of rational antimicrobial therapy was emphasized.

Keywords: *Staphylococcus aureus* resistant to gentamicin, outbreak, neonatal infections

Klin mikrobiol inf lék 2016;22(4):148–151

Adresa: MUDr. Lenka Hobzová, Oddělení nemocniční hygieny, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská tř. 581, 500 05 Hradec Králové, e-mail: lenka.hobzova@fnhk.cz

Došlo do redakce: 5. 1. 2017

Přijato k tisku: 16. 1. 2017

Úvod

Staphylococcus aureus (SA) přirozeně osidluje kůži a sliznice horních cest dýchacích přibližně 1/3 populace. Nosičství je častější u osob s kožním onemocněním nebo u zdravotníků.

SA může vyvolat pestrou škálu infekčních onemocnění od lokalizovaných zánětů kůže (např. impetigo), přes fokální (např. pneumonie) až po systémové (např. infekce krevního řečiště, cév).

Laboratorní průkaz SA spočívá především v přímém zachytu mikroba v daném materiálu (mikroskopický a kulti-vační nález), zásadní význam má hemokultivace při příznacích celkové infekce [1].

Lékem volby stafylokokových infekcí je oxacilin. Kmeny rezistentní k oxacilinu (meticilinu) jsou označovány jako MRSA a patří k typickým nemocničním patogenům. Pro kmeny MRSA je obvyklá sdružená rezistence k dalším skupinám antibiotik – zejména aminoglykosidům, fluorochinolónům, makrolidům a linkosamidům. Rezistence ke glyko-

peptidům (vankomycinu), které představují alternativu pro terapii infekcí vyvolaných MRSA, je zcela raritní.

Častým důvodem vzniku rezistence obecně je nesprávné a nadbytečné užívání antimikrobiálních látek. Na šíření kmenů se podílí nedodržování či nedostatečné dodržování hygienicko-protiepidemických opatření. V prevenci šíření rezistentních kmenů má význam celá řada postupů, nejdůležitější je aktivní surveillance, hygiena rukou, bariérová ošetřovatelská péče, izolace pacienta, dekolonizace [2–4].

Jednou z možností prevence šíření rezistentních mikrobu je dekolonizace, která brání rozvoji infekce u primárně kolonizovaného pacienta a omezuje další šíření mikrobu. Dekolonizace je způsob, jak bránit vzniku infekce a omezit šíření zejména rezistentních kmenů, což je nutné v době, kdy hrozí ztráta účinnosti antibiotik [5,6].

SA je jedním z nejvýznamnějších původců infekcí spojených se zdravotní péčí, způsobuje infekce krevního řečiště, infekce v místě chirurgického výkonu, infekce kůže a měkkých tkání, kostí a kloubů, CNS, močového ústrojí, absce-

dující pneumonie. U 12 % infekcí spojených se zdravotní péčí je etiologickým agens právě *Staphylococcus aureus* [7,8].

Charakteristika oddělení jednotky intenzivní a resuscitační péče pro patologické novorozence FN HK

Novorozenecký úsek Dětské kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK) je součástí novorozenecké části perinatologického centra a skládá se z jednotky intenzivní a resuscitační péče pro patologické novorozence (JIRP), oddělení intermediární péče, oddělení specializované novorozenecké péče a z oddělení fyziologických novorozenců. Základní spádovou oblast představuje region Východní Čechy. JIRP poskytuje neodkladnou resuscitační, intenzivní, intermediální a specializovanou péči pro donošené a nedonošené novorozence, včetně novorozenců nejnižších hmotnostních kategorií. V roce 2014 bylo na JIRP hospitalizováno celkem 308 dětí, průměrná délka hospitalizace byla 13,4 dne, celonemocniční průměrná délka hospitalizace v roce 2014 činila 8,7 dne.

V roce 2014 byly infekce spojené se zdravotní péčí (HAI, Hospital Associated Infections) ve FN HK evidovány u 13 % hospitalizovaných dětí JIRP, celonemocniční průměr evidovaných nákaz ve stejném období byl 2,9 %. Vysoký výskyt HAI byl zaznamenán v populaci rizikových pacientů – nezralé děti (stáří od 24. gestačního týdne), nízká porodní hmotnost, nezralost všech orgánových systémů, častá nutnost dechové podpory (NIV – neinvazivní ventilace, UPV – umělé plicní ventilace). Antibiotická (ATB) léčba je podávána vždy po konzultaci s ATB střediskem a je pravidelně přehodnocována. V případě indikované ATB léčby se postupuje bezodkladně z důvodu rizika rychle progresujícího průběhu infekce, rozvoje septického stavu či progresu do těžkého multiorgánového selhání (MOF). ATB léčba musí být dostatečně intenzivní, dávky se pohybují

v horním pásmu terapeutického rozmezí tak, aby byla zajištěna co nejrychlejší eradikace infekčního agens. V případě časných infekcí se podává především kombinace ampicilin + gentamicin, u pozdních infekcí zpravidla vankomycin, cefalosporiny 3. generace nebo karbapenemová antibiotika.

Při příjmu jsou každému pacientovi provedena skríninková vyšetření (k detekci přítomných mikroorganismů) – stěr z pupku, zvukovodu, žaludeční aspirát. V průběhu hospitalizace se provádějí odběry na mikrobiologické vyšetření při podezření na infekci.

Na oddělení JIRP probíhá od května 2012 sledování compliance hygieny rukou dle metodiky WHO. Sledování provádějí externisté – pracovníci Oddělení nemocniční hygieny (asistentky, epidemiologické sestry) a interní pracovníci – staniční sestra JIRP. Na JIRP je úroveň compliance hygieny rukou vysoká, cca 85 %, trend je příznivý, plynule rostoucí. Personál je pravidelně (1× týdně) seznamován s výsledky sledování a jsou diskutovány chyby v provádění hygieny rukou ve snaze zajistit včasnou nápravu.

Epidemický výskyt – stručný popis

V období od 30. 4. 2014 do 26. 5. 2014 byl zaznamenán zvýšený výskyt SA infekcí a kolonizací u hospitalizovaných dětí. Kmeny SA nalezené u dětí se jeví fenotypově podobné s výrazně žlutým pigmentem, vykazovaly rezistenci ke gentamicinu a inducibilní rezistenci ke klindamycinu, a proto byly zaslány k dotypování do Národní referenční laboratoře (NRL) pro stafylokoky, kde byla potvrzena fagotypová shoda a prokázána hyperprodukce toxinů A, D. Provedené epidemiologické šetření zjistilo šíření kmene mezi pacienty a personálem JIRP. V rámci prevence a kontroly jeho dalšího šíření byl zpřísněn hygienicko-protiepidemický režim na oddělení a zdůrazněna nutnost pokračovat v nastaveném režimu ATB politiky na JIRP – především striktně vysazovat ATB v případech, kdy již nejsou indikována.

Tabulka 1

Přehled pacientů, pohlaví, věku, hmotnosti, dnů (od začátku hospitalizace) a místa nálezů a významnosti (infekce/kolonizace)

Pacient/pohlaví	Věk v gestačních týdnech	Hmotnost v gramech	Den nálezu (den hospitalizace)	Místo nálezu (infekce)	Místo nálezu (kolonizace)
1./M index case	25	750	1.	pupek – omfalitida, sepse, MOF, úmrtí	
2./M	28	1 330	7.		spojivka vlevo, vpravo
3./Ž	25	930	14.	kůže – pustulka	
4./M	29	1 360	7.		rektum
5./M	32	1 850	13.	kubita – absces	
6. M	27	730	15.	pupek – omfalitida	spojivka, rektum
7. M	27	1 120	10.		spojivka, rektum
8. M	28	1 120	9.		zvukovod

SARG se shodnou rezistencí byl detekován u 8 dětí, z toho u 6 chlapců a 2 dívek. Věk pacientů se pohyboval od 25. do 32. gestačního týdne – průměrně 27,6 týdnů, hmotnost dětí byla v rozmezí od 750 g do 1 850 g – průměrně 1 148 g.

SARG byl během této epidemie poprvé detekován z výtěru, který byl u „prvního“ pacienta proveden 1. den jeho hospitalizace, u dalších dětí byl záchyt SARG od 7. do 15. dne jejich hospitalizací, jednalo se tedy o nemocniční přenosy.

Ve čtyřech případech SARG způsobil infekci, ve čtyřech případech se jednalo o kolonizaci.

Jako infekce bylo vyhodnoceno klinicky manifestní onemocnění s nutností terapeutického zásahu, jako kolonizace stav, kdy byla mikrobiologicky prokázána přítomnost patogenního mikroorganismu v určité lokalitě (v tomto případě SARG), ale nebyly přítomny známky infekce vycházející z této lokality, které by bylo možné dát do příčinné souvislosti s tímto nálezem.

Prvním případem v rámci epidemického výskytu (index case) byl chlapec narozený ve 25. gestačním týdnu, 1. den hospitalizace měl proveden výtěr z pupku, kde byl nalezen SARG, následně 3. den byla diagnostikována omfalitida, která postupně vyústila v SARG sepsi s toxickým šokem, následovalo MOF s úmrtím, ke kterému došlo 8. den hospitalizace. U tohoto pacienta nebylo nalezeno jiné infekční agens.

V dalších 3 případech infekce byl SARG původcem omfalitidy, abscesu v kubitě a pustulky na kůži. Tyto infekce byly sanovány v rámci podávání kombinované ATB léčby současných jiných pozdních infekcí, současně probíhající nekrotizující enterokolitidy kombinací imipenemu s vankomycinem, infekcí krevního řečiště způsobenou bakterií *Staphylococcus epidermidis* léčenou oxacilinem a pneumonie se syndromem dechové tísně léčenou kombinací ampicilin-sulbaktamem.

U 4 dětí s kolonizací byl SARG nalezen 1× ve spojivkách obou očí, 1× ve spojivkách obou očí a rektu, 1× v rektu, 1× ve zvukovodu.

Přehled pacientů, pohlaví, věku, hmotnosti, dnů (od začátku hospitalizace) a místa nálezů a významnosti (infekce/kolonizace) viz *tabulka 1*.

Všechny kmeny SA vykazovaly rezistenci ke gentamicinu, inducibilní rezistenci ke klindamycinu a hyperprodukcii enterotoxinů A, D, byla prokázána fagotypová shoda.

V okamžiku, kdy byla situace vyhodnocena jako epidemický výskyt, bylo provedeno epidemiologické šetření na oddělení, byl zkontrolován ošetrovatelský proces, dodržování bariérového ošetřování, dezinfekční program. Byly provedeny stěry z prostředí (neprokázaly výskyt SARG). Epidemiologické šetření zaměřené na kontrolu hygienicko-protiepidemického režimu neprokázalo systémový problém. V rámci šetření byly provedeny stěry veškerého personálu, který na JIRP pracuje (sestry, lékaři, sanitářky, uklízečky).

Stěry personálu

Bylo provedeno 156 stěrů od 52 osob, od každé osoby 3 stěry – nos, krk, ruce. Stěry od personálu byly anonymně odeslány ke zpracování do mikrobiologické laboratoře FN HK. SA rezistentní, vykazující shodu antibiogramu s předchozími izoláty novorozenců, byly odeslány do NRL pro stafylokoky, kde byla u všech 9 izolátů potvrzena fagotypová shoda.

V 18 stěrech u 15 osob byl nalezen běžný nerezistentní SA. Tento kmen se vyskytoval u 28,8 % osob, které se pohybují na JIRP, což odpovídá populačnímu průměru.

SARG byl nalezen v 9 stěrech u 6 osob, tj. u 11,5 % personálu JIRP. Místo nálezů SARG a pracovní zařazení personálu viz *tabulka 2*.

Výsledky stěrů personálu byly individuálně sděleny jednotlivým osobám. Pozitivním osobám byla doporučena dekolonizace, jednak lokální dekolonizace nosu mupirocinem – 2× denně po dobu 5 dnů, ale i celotělová – 2× denně celotělové mytí přípravkem určeným k dekolonizaci MRSA po dobu 5 dnů. Dekolonizaci provedly 4 osoby, 2 sestry dekolonizaci neprovedly z důvodu těhotenství, na oddělení se před nástupem na mateřskou dovolenou již nevrátily. S odstupem cca 1 měsíce byla provedena kontrola účinnosti dekolonizace, 2 osoby po provedení dekolonizace zůstaly pozitivní (u obou kolonizovaný nos), u dvou osob dekolonizace proběhla úspěšně a byly opakovaně negativní (nos, krk i kůže).

Diskuze

SA se vyskytuje v populaci běžně, ale jeho význam se nesmí podceňovat. I běžný citlivý kmen SA je častým původcem širokého spektra infekcí od banálních až po závažné a život ohrožující. Původ SA infekcí je buď endogenní, kdy vychází z přirozeného osídlení pacienta, nebo exogenní, pokud dochází k přenosu z rezervoáru v prostředí (kontaminované předměty) nebo z jiných osídlených osob (pacienti, personál).

Přenos SA ve zdravotnickém zařízení se děje nejčastěji rukama personálu, možný je přenos kapénkami při nedodržívání respirační etikety nebo aerosolem. Aerosol vzniká při ošetrovatelských úkonech, diagnostických a léčebných intervencích, nejčastěji v dýchacích cestách kolonizovaných

Tabulka 2
Personál dle pracovního zařazení a pozitivní výsledky – nález SARG

Pracovní zařazení	Nález SARG nos	Nález SARG krk	Nález SARG ruce	Celkem pozitivních osob
Lékař	2×	1×	1×	2 (1× nos a krk, 1× nos a ruce)
Sestra	4×	0	1×	4 (3× nos, 1× nos a ruce)
Sanitář	0	0	0	0
Uklízečka	0	0	0	0

nebo infikovaných nemocných. Aerosol může následně kontaminovat nemocniční prostředí.

Od běžného SA se liší jeho nemocničních rezistentní kmeny obtížnější léčbou (výběr antibiotik k léčbě je menší). Tyto kmeny ohrožují oslabené jedince, ke kterým patří novorozenci, zejména předčasně narození.

Infekce SA může vzniknout u každého člověka, populaci s vyšším rizikem vzniku SA infekce tvoří lidé s chronickým onemocněním, jako např. diabetici, onkologicky nemocní, osoby s chronickým onemocněním dýchacích cest. Ve zdravotnickém zařízení je vyšší riziko závažnější SA infekce u pacientů s oslabeným imunitním systémem, dále u kriticky nemocných v intenzivní péči, mezi které patří i nezralí novorozenci [1,9]. Kolonizace SA představuje vyšší riziko vzniku infekce SA, pacienti kolonizovaní SA při přijetí do nemocnice mají 15× vyšší výskyt pneumonie ve srovnání s nekolonizovanými pacienty [10]. Infekce způsobené SARG jsou spojeny s vyšší mortalitou (73 %) ve srovnání s infekcemi způsobenými běžnými kmeny SA (28 %) [11]. Co se týká výskytu infekcí nebo kolonizací SARG u novorozenců, vyšší výskyt je popisován u dětí s nižší porodní váhou, gestačním stářím, inkubátorovou péčí a současnou nebo přechodnou léčbou gentamicinem [12].

Pro kontrolu epidemického výskytu a šíření SARG na neonatologických JIRP má zásadní význam dodržování protiepidemických opatření včetně kohortování pozitivních pacientů, adekvátně provedená dezinfekce prostředí včetně terminální dezinfekce s použitím dezinfektoru prostoru. S výhodou je provádění skríninku pacientů při přijetí a následně skrínink 1x týdně prováděný u všech hospitalizovaných. K epidemickým výskytům SARG včetně výskytů na neonatálních jednotkách intenzivní péče přispívají individuální selhání v compliance hygieny rukou a kontaminované prostředí [13].

První případ v rámci popisovaného epidemického výskytu bylo dítě předčasně narozené, nezralé, s nízkou porodní hmotností. Gravidita matky byla hodnocena jako riziková. Matka byla astmatička, psoriatička, v těhotenství byla léčená antibiotiky, kortikoidy. Naposledy těsně před porodem byl podán penicilin (tablety). První ošetření novorozence po porodu proběhlo personálem JIRP, což je obvyklý postup při porodech dětí nízkého gestačního stáří. Nelze vyloučit, že infekce tohoto dítěte vznikla přenosem SARG z ošetřujícího personálu, ale nelze vyloučit ani přenos od matky – nebyla zjišťována eventuelní pozitivita SARG u matky.

Popisovaný kmen SARG se v podmínkách našeho novorozeneckého oddělení ojediněle vyskytuje, je nalézán ve stěrech z prostředí, ale i u hospitalizovaných novorozenců, kdy se zpravidla se jedná o kolonizace. V roce 2013 se jednalo o 13 nálezů SA s rezistencí ke gentamicinu, 31 nálezů SA s rezistencí ke gentamicinu a inducibilní rezistencí ke klindamycinu, 3 novorozenci měli nález již v příjmovém výtěru. V celkem 12 případech se jednalo o infekci, v ostatních případech o kolonizaci. V roce 2014 bylo zachyceno celkem 95 nálezů SA s rezistencí ke gentamicinu, z toho se jednalo v 18 případech o infekci. Vyšší záchyt SARG si vysvětlujeme rekonstrukcí prostor JIRP, které v tomto roce proběhly. Personál pracoval v podmínkách, kdy bylo náročnější dů-

sledně dodržovat všechna hygienicko-protiepidemická opatření. Po přestěhování do nových prostor se počet záchytů SARG snížil.

Na základě zhodnocení průběhu epidemie a znalosti výsledků stěrů personálu byla provedena edukace personálu. Byl zdůrazněn význam hygieny rukou a principu kolektivní odpovědnosti při dodržování protiepidemických opatření. Na oddělení je vysoká úroveň compliance hygieny rukou, ale každé individuální pochybení jednotlivce může mít závažné následky. Byl zpřísněn režim používání ústenek, zavedlo se nošení ústenek při každém kontaktu s dítětem, osoby s respiračními příznaky musejí nosit ústenky po celou pracovní dobu. Provedení dekolonizace personálu mělo pouze částečný úspěch, otázkou je správnost provedení dekolonizace prováděné individuálně v domácím prostředí.

Antibiotická politika je na tomto oddělení adekvátně nastavená, ATB se podávají pouze v indikovaných případech a léčba je pravidelně přehodnocována.

Závěr

Výskyt SARG kolonizovaných osob v podmínkách novorozeneckého oddělení představuje riziko s potenciálem epidemického šíření a vznikem až život ohrožujících infekcí spojených s poskytovanou zdravotní péčí.

Sledování výskytu rezistentních bakteriálních kmenů a nastavení včasných a racionálních protiepidemických opatření je jednou z priorit nemocničního týmu kontroly infekcí. Včasná diagnostika, přesná identifikace původce, znalost rezistence k antimikrobiálním látkám mají terapeutický, epidemiologický význam a přispívají k racionální antibiotické politice ve zdravotnickém zařízení. V tomto případě zpřísnění hygienicko-protiepidemických opatření vedlo k ukončení epidemického výskytu a od té doby se další outbreak tohoto rezistentního kmene nevyskytl.

Literatura

- Jindrák V, Hedlová D, Urbášková P a kol. Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici. Praha: Mladá fronta a. s.; 2014.
- Nathan C, Cars O. Antibiotic Resistance – Problems, Progress, and Prospects. *N Engl J Med*. 2014;371:1761–1763.
- www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threat.html
- Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the US, 2013. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. Available from: <http://www.cdc.gov/AntibioticResistanceThreats/index.html>
- Huang SS, Septimus E, et al. Effect of surface decolonisation on bacteriuria and candiduria in intensive care units: an analysis of a cluster-randomised trial. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;1:70–79.
- http://www.ahrq.gov/professionals/systems/hospital/universal_icu_decolonization/index.html
- Šrámová H a kol. Nozokomiální nákazy. Praha: Maxdorf; 2013.
- Edmond MB, Wallace SE, et al. Nosocomial Bloodstream Infections In US hospitals: A Three Year Analysis. *Clin Infect Dis*. 1999; 29:239–244.
- <https://www.cdc.gov/HAI/organisms/staph.html>
- [http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(16\)30428-1/fulltext](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(16)30428-1/fulltext)
- Semel JD, Trenholme GM, Levin S. Gentamicin- and clindamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Med Sci*. 1980;280(1):4–9.
- Graham DR, Correa-Villasenor A, Anderson RL, et al. Epidemic neonatal gentamicin-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection associated with non-specific topical use of gentamicin. *J Pediatr*. 1980;97(6):972–978.
- Otter JA, Davies B, et al. Identification and control of a gentamicin resistant, methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* outbreak on a neonatal unit. *Journal of Infection Prevention* 2014. Available from: <http://bjj.sagepub.com/content/early/2014/02/11/1757177413520057>

NK buňky klasické a méně známé

S. FRYDRYCHOVÁ, V. BOŠTIKOVÁ, P. BOŠTÍK,

Katedra epidemiologie, FVZ UO, Hradec Králové

SOUHRN

Frydrychová S., Boštíková V., Boštík P.: **NK buňky klasické a méně známé**

NK buňky (Natural Killer neboli přirození zabíječi) jsou důležitou složkou obranných reakcí lidského organismu proti virům, bakteriálním a parazitárním intracelulárním patogenům stejně jako proti nádorově změněným buňkám. NK buňky jsou schopny velmi rychlé odpovědi, a to bez předchozí senzibilizace. Produkuje široké spektrum cytokinů a chemokinů, regulujících jak přirozenou, tak získanou imunitní odpověď. Stres, obdobně jako nadměrná fyzická zátěž, může vést ke snížení počtu NK buněk, a následně tak zvýšit vnímavost lidského organismu k virovým, bakteriálním či parazitárním onemocněním. Historicky bylo na NK buňky pohlíženo jako na přirozené zabíječe s relativně jednoduchou regulací jejich funkcí. Nové poznatky ale ukázaly, že NK buňky hrají roli v mnoha procesech a jejich role a regulace u mnoha infekčních onemocnění je komplexní záležitost. Tento souhrn si všímá nových možných rolí NK buněk při virových infekcích, rozvoji autoimunity a jejich specifických funkcí v některých orgánech.

Klíčová slova: NK buňky, imunitní systém, cytotoxicita, buněčné populace, HIV, dengue, CD 57, autoimunita

SUMMARY

Frydrychová S., Boštíková V., Boštík P.: **Classical and less known NK cells**

Natural killer (NK) cells represent an important component of the human body's defense against viruses, bacteria and other intracellular pathogens as well as against tumor cells. NK cells are capable of very fast response without prior sensitization. They produce a wide range of cytokines and chemokines regulating both innate and acquired immune responses. Similar to excessive physical activity, stress can lead to a reduction in the numbers of NK cells, consequently increasing the susceptibility of the organism to viral, bacterial or parasitic diseases. Historically, NK cells were viewed as natural killers with relatively simply regulated functions. But new findings have shown that NK cells play roles in many processes and regulation of their functions in many infectious diseases represents a complex issue. This review presents new potential roles of NK cells in viral infections, autoimmunity and their specific functions in some organs.

Keywords: NK cells, immune system, cytotoxicity, cell populations, HIV, dengue, CD 57, autoimmunity

Klin mikrobiol inf lék 2016;22(3):152–160

Adresa: doc. RNDr. Vanda Boštíková, Ph.D., katedra epidemiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany Hradec Králové, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, e-mail: vanda.bostikova@unob.cz

Došlo do redakce: 21. 4. 2016

Přijato k tisku: 28. 7. 2016

Obecná charakteristika NK buněk

NK buňky jsou jedněmi z důležitých efektorů buněčné přirozené imunity. Jsou to přirození zabíječi (natural killers – NK cells), kteří se projevují v obraně proti virovým agens a nádorovým buňkám. V současné době jsou spojovány a studovány zejména pro jejich účast během infekce HIV a SIV infekce u opic. Hrají také roli během těhotenství, kdy jsou sledovány jejich hladiny. Pokud je počet NK buněk příliš vysoký, lékaři se někdy v těchto případech uchylují k opatřením, která vedou ke snížení počtu NK buněk, což prospívá ve výsledku k úspěšnému těhotenství. Další roli hrají NK buňky při odpovědi na stres. Pro svou schopnost

spontánně usmrcovat různé buňky jsou často označovány jako buňky spontánní cytotoxicity. NK buňky jsou na svém povrchu obdařeny Fc-receptory, díky nimž zabíjí nádorově zvrhlou buňku či buňku napadenou virem. V závislosti na tomto způsobu zabíjení se NK buňky řadí mezi buňky schopné ADCC, tj. na protilátce závislá buňkami zprostředkovaná cytotoxicita. Viz obr. 1.

Diferenciace a maturace NK buněk

NK buňky se vyvíjí z hematopoetických pluripotentních kmenových buněk, které migrují z kostní dřeně do lymfatic-

kých tkání, přes stádium lymfoidní progenitorové buňky (společně NK buňkám, T a B-lymfocytům) přes stadia pre-NK buňky, pro-NK buňky a nezralé NK buňky. Ty dále vyžívají v CD16-CD27+CD56^{bright} NK buňky. Velká část těchto CD56^{bright} buněk vyžívá v CD16+CD27-CD56^{dim}. Většina z CD56^{dim} NK buněk poté opouští lymfatické tkáně a je přítomna v krevním oběhu, naopak CD56^{bright} NK buňky zůstávají především v lymfatických uzlinách a interagují s dendritickými buňkami.

Pro každé vývojové stádium NK buňky je charakteristické spektrum přítomných povrchových znaků. Důležitou roli v diferenciaci má účast různých transkripčních faktorů, mezi něž řadíme Notch-LΔ4, ligand pro tyrozinovou kinázu FLT3 a IL-7. Membránově vázaný interleukin 15 hraje klíčovou roli ve vývoji a diferenciaci NK buněk. Hlavní zdroj IL-15 pro NK buňky představují dendritické buňky a makrofágy [1]. Viz obr. 2.

Heterogenita NK buněk

U lidí je více jak 95 % NK buněk CD3- a na svém povrchu exprimují znak CD8 homodimerní řetězce (α/α) [2]. Dále mohou být tyto NK buňky rozděleny dle hustoty povrchové exprese CD56 a CD16. CD56 se označuje jako NCAM (neural cell adhesion molekule), jedná se o adhezivní molekulu, která se exprimuje na povrchu neuronů, glií, kosterních svalů a NK buňkách. Molekula CD16 představuje Fc- γ -RIII receptor. Dvě hlavní subpopulace NK buněk byly charakterizovány těmito znaky – CD3⁺CD56^{bright}CD16⁻ a CD3⁺CD56^{dim}CD16⁺. Tyto dvě podskupiny se také liší v expresi znaku CD27.

Zatímco u subpopulace CD3⁺CD56^{dim}CD16⁺ k expresi CD27 nedochází, u CD3⁺CD56^{bright}CD16⁻ se tento znak exprimuje a je snadno detekovatelný [3].

Přítomnost těchto dvou subtypů se liší i v lokalizaci. Zatímco v lymfatických tkáních jsou kolem 90 % přítomny NK buňky s fenotypem CD16⁻CD27⁺CD56^{bright}, v periferní krvi převládají NK buňky CD16⁺CD27⁻CD56^{dim} [4]. Původně nebylo jisté, zdali tyto dvě fenotypově odlišné populace NK buněk představují zcela diferenciované buňky, v současné době se řada studií přiklání k tomu, že subpopulace CD56^{bright} NK buněk v lymfatických tkáních se vyvíjí a diferencuje v CD56^{dim} NK buňky. Mechanismus není zcela jasný, ale předpokládá se spolupráce s ostatními buňkami, jako jsou dendritické buňky či fibroblasty.

CD56^{bright}CD16⁻ NK buňky exprimují naváděcí receptory jako CCR7 a CD62L a mají schopnost vylučovat cytokiny INF- γ a TNF- α . NK buňky CD56^{dim}CD16⁺ jsou hlavními činiteli v cytotoxicitě na MHC nezávislé a obsahují velké množství granzymů a perforinů [5].

Existují i další linie NK buněk. Radíme mezi ně vysoce specializované uterinní NK buňky a NK buňky gastrointestinálního traktu. Uterinní NK buňky jsou ale stále ještě heterogenní skupina. NK buňky endometria se svým fenotypem i funkcí liší od NK buněk osidlujících deciduální tkáň. Tyto buňky jsou obohaceny o speciální markery a jejich funkcí není pouze cytotoxicita, ale podílejí se také na správné remodelaci spinálních artérií [6].

NK buňky gastrointestinálního traktu (GIT) se liší od populace v krevním řečišti a jsou charakterizovány expresí

NKp44 u lidí a NKp46 u myši a produkci interleukinu IL-22. I proto jsou někdy nazývány jako NK-22 podtyp [7]. Význam některých populací NK buněk v jednotlivých orgánech je podrobněji diskutován níže.

Význam markeru CD57

Molekula CD57 byla poprvé identifikovaná na buňkách přirozené cytotoxicity za použití myších monoklonálních protilátek HNK-1, Leu-7 v roce 1989 [8]. Původně se myslelo, že se jedná o znak exprimovaný pouze na NK buňkách [9]. Později se ukázalo, že marker CD57 je exprimován pouze na určitém podtypu NK buněk [10]. Následně byl tento znak identifikován také na CD8⁺ T buňkách a na buňkách neurální lišty během intrauterinního vývoje [11]. CD57⁺ NK buňky diferencují z CD56^{dim}CD57⁻ NK buněk nevratným procesem. Jedná se pravděpodobně o poslední krok v maturaci NK buněk [12]. Ve srovnání s CD57⁻ NK buňkami, CD57⁺ NK buňky mají horší proliferaci schopnost v odpovědi na IL-2 a IL-15 a produkují méně INF- γ v odpovědi na IL-12 a IL-18. Část CD57⁺ NK buněk si zachovává schopnost tvořit INF- γ po zesílení s molekulou CD16 [13]. Progrese CD56^{bright} k CD56^{dim}CD57⁻ a dále k CD56^{dim}CD57⁺ reflektuje cestu maturace NK buněk a jejich posun ke zvýšené cytotoxické schopnosti, lepší schopnosti odpovídat na signály přes molekulu CD16, NCRs a stejně tak reflektuje sníženou schopnost odpovědi na cytokiny [14]. Exprese tohoto markeru se zvyšuje s věkem a je asociována s chronickými infekcemi či tumory. Protinádorová imunita je realizována účinkem perforin/granzimového komplexu nebo mechanismem Fas zprostředkované apoptózy [15]. Snížená exprese MHC I molekul a *de novo* exprese stresových molekul (MICA, MICB, B7-H6, RAE-1, MULT1) vede k aktivaci NK buněk [16]. Vysoké hodnoty s nádorem asociovaných CD57 NK buněk jsou zaznamenávány u onkologických pacientů a často jsou spojovány s méně závažnými nemocemi a lepším výsledkem onemocnění [13]. Na druhou stranu, jak bylo zjištěno při léčbě pokročilého gastrointestinálního stromálního tumoru pomocí chemoterapeutik, sekrece INF- γ NK buňkami po stimulaci IL-12/IL-2 koreluje s delší dobou přežití [17]. Na základě této informace se předpokládá, že pro boj proti nádorovému onemocnění je nevhodnější heterogenní skupina NK buněk, a to jak CD57⁻ a CD57⁺, které dohromady poskytují tu nejlepší schopnost obrany [18].

Vedle nádorových onemocnění je marker CD57 zmiňován také v souvislosti s autoimunitními onemocněními. Autoimunitní onemocnění je trvale spojeno se sníženým počtem cirkulujících CD57⁺ NK buněk a se zhoršením NK buněčné cytotoxicity [19–21]. Na základě této informace se předpokládá, že cytotoxické CD57⁺ NK buňky mohou hrát regulační úlohu pro další složky imunitního systému.

Mezi chronická onemocnění zkoumaná v závislosti na CD57 patří zejména infekce CMV. Bylo zjištěno, že u osob infikovaných virem CMV rapidně stoupá počet CD57⁺ NK buněk současně s expresí KIR, NKG2C a CD158b a poruchou tvorby INF- γ . HCMV totiž způsobí expanzi NKG2C⁺ NK buněk a právě tyto buňky přednostně exprimují CD75 [22–23].

„Neklasické“ lymfoidní populace přirozené imunity

Po dlouhou dobu se myslelo, že NK buňky (a buňky jim příbuzné, jako buňky NKT a LAK) představují jediné lymfoidní populaci přirozené imunity. V posledních letech bylo prokázáno, že existují i další populace lymfoidních buněk imunitního systému (ILC = innate lymphoid cell), které se nacházejí na sliznicích a dokážou rychle reagovat na produkováné cytokiny v postiženém místě a představují tak první linii obrany proti patogenu. Vzhledem k tomu, že konvenční NK buňky mají stejnou schopnost okamžité odpovědi na cytokiny, může se na ně pohlížet jako na určitý prototyp všech ILC podtypů. NK buňky ovšem oplývají schopnostmi, které ostatní ILC nemají, jako je cytotoxicita. ILC jsou heterogenní skupinou, která se v současné době dělí na tři hlavní podtypy: ILC1, ILC2 a ILC3 [24].

ILC1 se vyznačují produkcí cytokinu INF- γ . Řadí se sem jak konvenční NK buňky, tak několik přídatných buněčných podtypů produkujících INF- γ [25]. Jako příklad je uveden ILC1 buněčný podtyp, který se nachází v slizničních tkáních. Vyznačuje se expresí CD127, CD161, neexprimuje znak pro NK linie CD94, CD56, NKp46 a NKp44, dále neexprimuje kit (receptor pro faktor kmenových buněk), který značí většinu dalších ILC podtypů [26]. Další podtyp ILC1 byl identifikován v tkáních mandlí, vyznačuje se expresí několika znaků společných s NK buňkami – CD56, NKp44 a NKp46. Tento podtyp navíc exprimuje znak paměťových CD8 T-lymfocytů rezidentních v konkrétní tkáni – CD103, CD49a a CD101 [27].

Skupina ILC2 podtypů je charakterizovaná produkcí cytokinů IL-5 a IL-13 společným Th2 lymfocytům, dále tvoří amphiregulin IL-9, přičemž signalizace IL-9/IL-9 receptor je pro přežití naprosto klíčová [28,29]. ILC2 se vyskytují v různých tkáních, např. tukové tkáni, střevě a plicích či kůži [30,31]. Jejich funkcí je podpora při odstranění patogenu z organismu, udržují homeostázu v plicích a řídí hyperreaktivitu dýchacích cest při virových infekcích [32–34].

Třetí skupina ILC3 podtypů produkuje cytokin IL-17 společný Th17 lymfocytům a/ nebo IL-22 [35]. Do této skupiny řadíme linie (Lin)ROR γ ⁺CD4⁺Lti-like cells,

Lin⁻ROR γ ⁺CD4⁻Lti-like cells, NCR⁺ ILC3 původně pojmenované NK-22 a ILC3 tenkého střeva Sca1⁺Thy1^{high} [7,36,37]. ILC-3 se uplatňují v rychlé odpovědi na IL-23, exprimují IL-1 receptor a odpovídají tak na IL-1b. Nachází se v tenkém střevě a tlustém střevě, v Peyerových placích [38,39].

Role NK buněk u virových onemocnění

Role NK buněk v průběhu infekce HIV

V poslední době je NK buňkám připisována významná role během infekce HIV-1, a to zejména z počátku infekce. NK buňky mají schopnost eliminovat infikované buňky bez předešlého stimulace antigenem, na rozdíl od buněk získané imunity, které vyžadují předchozí senzitivizaci. Získaná imunitní odpověď potřebuje několik dní, aby se mohla vyvinout. Navíc její optimální požadovaný efekt je dosažen až za několik týdnů po infekci. Do té doby udržují virus pod kontrolou NK buňky [40].

Na druhou stranu se ukázalo, že virus HIV ovlivňuje funkci NK buněk, a to tak, že už brzy po infekci se indukuje proliferace a aktivace NK buněk, aby se mohly podílet na zabíjení infikovaných buněk. Sekrecí cytokinů INF- γ a TNF- α aktivují odpověď typu Th-1 a B lymfocytů [41].

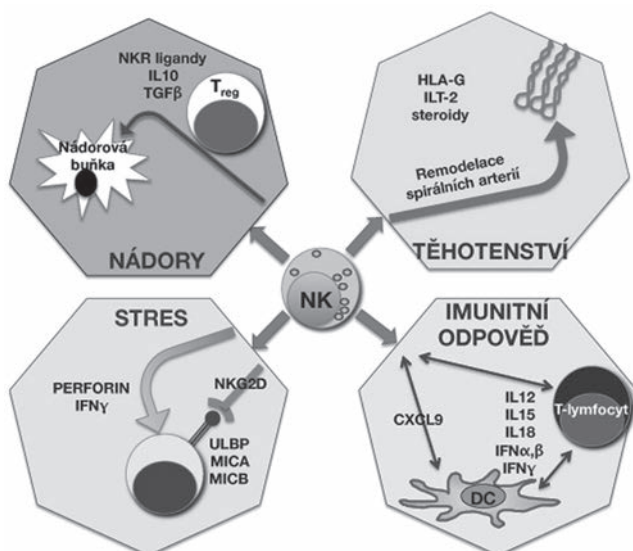
Mechanismem, kterým NK buňky bojují při HIV infekci, může být eliminace buněk přímou toxicitou zprostředkovanou sníženou nebo inhibovanou expresí MHC molekul na infikovaných buňkách. HIV virus má totiž schopnost snižovat nebo eliminovat expresi MHC-I molekul na povrchu hostitelských buněk jako prevenci cytotoxické reakce CD8+ lymfocytů. NK buňky jsou ovšem způsobilé k zabíjení i těch buněk, exprimují nízký počet nebo žádné vlastní MHC-I molekuly. Protein Nef viru HIV Nef indukují produkci stresových faktorů MICA/B postiženými buňkami, které aktivují NK buňky. Nef také sice inhibuje expresi HLA-A a B molekul, ale nemá tento efekt na HLA-C či HLA-E – ligandy pro NK buňky. Nicméně bylo prokázáno, že u nemocných s HIV postupem onemocnění NK buňky vykazují snížené cytotoxické funkce [40].

Protilátkami zprostředkovaná cytotoxicita NK buněk je u pacientů s HIV také snižena. Tento fakt je způsoben dalším ochranným mechanismem HIV viru, a to vylučováním určitých metaloproteináz ze svého matrix, které se naváží na molekulu CD 16 na povrchu NK buňky, která je odpovědná za ADCC [42].

Další mechanismus NK buněk v ochraně proti viru je sekrece cytokinů a chemokinů jako například CCL3, 4 nebo 5. Ty se vážou na koreceptor HIV-1 CCR5 a zabraňují tak vstupu viru do buňky. Působky NK buněk pak obecně indukují zánětlivou odpověď, modulují hematopoézu, regulují růst a funkce monocytů a granulocytů a ovlivňují typ adaptivní imunitní odpovědi [43].

Některé studie se také soustředily na efekt HIV infekce na jednotlivé subpopulace NK buněk, HIV-1 pozitivní pacienti vykazovali celkově snížení počtů CD56^{dim} i CD56^{bright} NK buněk, zatímco subpopulace CD16⁺CD56⁻ vykazovala zvýšení [44]. HIV infekce neovlivňuje pouze počet jednotli-

Obr. 1
Základní funkce NK buněk (autor Pavel Bošтік)



vých podtypů NK buněk, byly totiž prokázány i určité odchylky v expresi aktivačních a inhibičních receptorů, především KIRs a NCRs. U některých pacientů infikovaných HIV virem NK buňky subpopulace CD16⁺CD56⁻ exprimují na svém povrchu ve zvýšené míře inhibiční KIR receptory, které jsou ovšem nefunkční. U aktivačních NCRs receptorů dochází vlivem HIV k jejich snížení [45,46].

Další oblastí zvýšeného zájmu je v posledních letech zkoumání alelických variant genů KIR a HLA-I receptorů a jejich spojitost s průběhem a výsledkem HIV infekce. Určité alelické varianty genů pro HLA molekuly mají vztah s vnímavostí, průběhem a průběhem infekce HIV-1. Flores-Villanueva zjistil, že lidé s infekcí HIV-1 neléčení antivirotiky, u nichž byla prokázána menší replikace viru, byli vesměs homozygoti pro alely Bw4 třídy [47]. Do Bw4 třídy se řadí alely B*57, B*27, B*51 a B*58 které vedou k protekci proti HIV. Na rozdíl od alely B*35Px, která do této třídy nepatří a je spojována s rychlejším průběhem onemocnění [48]. Bylo zjištěno, že epitop Bw4 obsahuje podtyp alel označujících se jako Bw4Ile80, které nesou izoleucin v pozici 80. Právě prostřednictvím tohoto epitopu Bw4Ile80 HLA molekula interaguje s inhibičním KIR3DL1 receptorem [49].

KIR3DS1 receptor má sice krátký intracelulární řetězec, ovšem svou extracelulární částí se velmi podobá sekvenci KIR3DL1 receptoru, proto se i u této varianty receptoru předpokládalo, že se váže k Bw4Ile80 molekule. Tato hypotéza nebyla doposud jednoznačně potvrzena. Rozsáhlé studie u lidí infikovaných HIV-1 ovšem ukázaly, že jedinci s expresí jak Bw4Ile, tak KIR3DS1 vykazovali výrazné zpomalení průběhu onemocnění. Ze studie bylo zřejmé, že jedinci exprimující kombinaci Bw4Ile80/KIR3DS1 molekul mají ve výsledku jednoznačně pomalejší progresi onemocnění než jedinci exprimující pouze Bw4Ile80 nebo KIR3DS1 [50].

Jiná studie pod vedením Merina se zase soustředila na zkoumání konkrétního subtypu HIV-1. Výsledky ukázaly, že u subsaharských Afričanů v Zambii existuje spojitost mezi exprimovanou alelou KIR2DS4*001 a zvýšeným přenosem HIV-1 subtypu C [51].

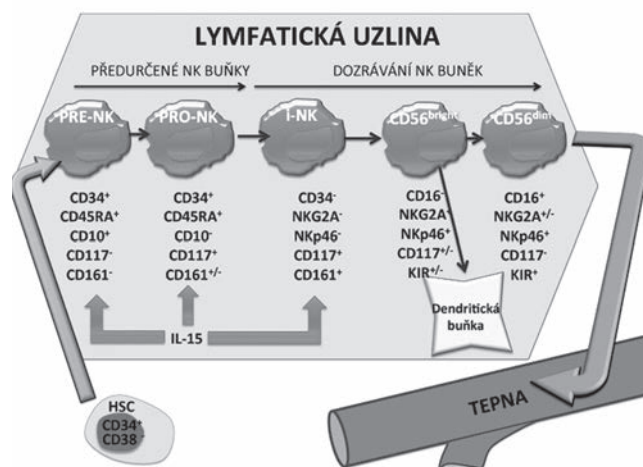
Role NK buněk u horečky Dengue

Dengue horečka představuje zásadní zdravotní problém v tropických a subtropických oblastech. Onemocnění je způsobeno čtyřmi sérotypy viru dengue (DENV-1, -2, -3, -4) přenášených komárem *Aedes* [52]. Mnoho studií se soustřeďuje na roli NK buněk v boji proti infekci virem Dengue, a to zejména v časných stádiích infekce.

Intersticiální dendritické buňky jsou považovány za první linii obrany proti napadnutí virem DENV v anatomických místech, kde se virus replikuje po počátečním kousnutí infikovaným komárem – vektorem. Typ-I na interferonu závislá imunita hraje klíčovou roli a časná aktivace NK buněk může být také důležitá pro omezení virové replikace [53,54].

Vysoký absolutní počet NK buněk byl objeven u pacientů s mírnou horečkou dengue ve srovnání s počtem buněk u dětí, u kterých se vyvinula hemoragická dengue horečka. Na druhé straně procento NK buněk a CD8⁺ T-lymfocytů

Obr. 2
Maturace NK buněk v lymfatických uzlinách
(autor Pavel Boštit)



exprimujících marker aktivace CD69 bylo vyšší u infekce dětí s hemoragickou horečkou dengue [55–58].

Jak se ukázalo, NK buňky nehrají pouze ochrannou funkci během infekce, ale po infiltraci viru do jater odpovídají za smrt buněk v játrech v časně fázi infekce, zatímco CD8⁺ T-lymfocyty za pozdější odstranění. Mechanismus, kterým NK buňky způsobí buněčnou smrt, není zatím zcela objasněn, ale je pravděpodobné, že NK buňky zabíjí virem Dengue infikované buňky. Je možné, že za určitých podmínek může eliminace infikovaných buněk NK buňkami vést ke stavu, kdy jsou imunitní efektorové buňky odpovědné za zranění orgánů. Podobně i NKT buňky mohou být za jistých podmínek škodlivé během patogeneze dengue [59,60].

NK, NKT a T-lymfocyty mohou odpovídat na podněty nezávisle na vazbě na TcR receptor. Jsou hlavním zdrojem INF- γ v imunitní odpovědi indukované inaktivovaným virem dengue, ovšem jak bylo zjištěno, množství INF- γ produkujících buněk je velmi nízký [61,62].

NK buňky mohou zprostředkovat ADCC proti buňkám infikovaných DENV, právě tento mechanismus může být důležitý během sekundární infekce, když jsou přítomny protilátky proti DENV. Zajímavé je, že vysoká aktivita ADCC měřená po sekundární infekci DENV-3 byla spojována s nižší následnou virémií, čímž je připisována ochranná role protilátkám a NK buňkám, avšak tato spojitost už následně nebyla objevena u sekundární infekce DENV-2 [63,64].

NK buňky (CD16⁺CD11b⁺) mají schopnost lyzovat infikované buňky ve vyšší míře než neinfikované buňky, dokonce bez přítomnosti protilátek, díky mechanismu přímého rozpoznání. Hershkovitz a kol. popsali, že receptor NKp44 může přímo interagovat s obalovým virovým proteinem E [65].

NK buňky a autoimunita

Všechna autoimunitní onemocnění, jak orgánově specifická (DM, MS), tak systémová (SLE), mají jednu základní společnou vlastnost, a tou je adaptivní B-buněčná (auto-protilátky) a/nebo T-buněčná (autoreaktivní T-lymfocyty)

odpověď na vlastní struktury. Některé studie ukazují, že získaná B- nebo T- buněčná autoimunitní odpověď vzniká mnohem dříve před objevením klinických symptomů. Autoimunitní onemocnění se vyvíjí po dlouhá léta, jedná se o mnohokrokový proces, při kterém se uplatňuje genetický podklad, ale přispívají také zatím ne zcela definované faktory prostředí. Většina znalostí o NK buňkách u autoimunitních onemocnění je získána z analýz NK buněk od pacientů v klinickém stadiu onemocnění. Nicméně v tak dynamickém procesu, jako je vznik autoimunitního onemocnění, by se měla úloha NK buněk zkoumat jak v preklinickém, tak klinickém stadiu onemocnění [66].

Přirozená cytotoxicita NK buněk je regulována cytotoxickými receptory (NCRs) a jejich na protilátce závislá cytotoxicita je spojena s CD16/FcγRIIIa [67]. Receptory NKG2D, molekula-1 a receptor o velikosti 80kDa jsou vedle NCRs dalšími aktivačními receptory. Některé jejich ligandy jsou exprimovány pod vlivem zánětlivých procesů a jsou zapojeny do autoimunitních nemocí. Identifikace multigenních a multialelických inhibičních a aktivačních receptorů KIRs pro MHC-I molekuly pomohla obohatit naše znalosti o spojitosti genetického pozadí u autoimunitních onemocnění [68].

U diabetu prvního typu existuje souvislost s KIR2DS2/HLA-C1 genotypem a snížení v poměru inhibičních KIR/HLA. U psoriatické artritidy byly prokázány pozitivní korelace k rozvoji onemocnění u kombinace genotypu KIR2DS1/2DS2 a homozygotní formy HLA-Cw [69–71]. Podobně systémová skleróza je spojena s KIR2DS2+/2DL2 genotypem a s 2DS1+/2DS2 genotypem. Navíc pacienti s variantou KIR2DS1+ s progresivní systémovou sklerózou vykazují značný úbytek počtu inhibičních KIRs odpovídající příslušnému ligandu HLA-C [72,73].

Genetické studie tedy ukázaly souvislost mezi konkrétními variantami KIR receptorů a jejich ligandů – HLA molekul v souvislosti s vyšší pravděpodobností autoimunitního onemocnění. Jak se ukázalo, většina z těchto situací je asociována s potenciálním nedostatkem NK buněčné inhibice nebo s nadměrnou aktivací NK buněk přes receptory pro MHC-I.

Právě porucha tolerance NK buněk k vlastním strukturám, které lze dosáhnout snížením inhibičních signálů či zvýšením aktivačních signálů, je jednou z hypotéz role NK buněk u autoimunitních onemocnění. V takovém případě jsou totiž NK buňky odpovědné za poranění tkáně v důsledku působení jejich přirozené cytotoxicity. Například pacienti s nedostatkem *Tap* proteinu (transporter associated peptide) neexprimují MHC-I molekuly, představují tak model sníženého inhibičního signálu. U těchto pacientů jsou přítomny vážné destrukce tkání [74]. Ovšem nutno podotknout, že samotná absence MHC-I molekul přímo neindukuje cytotoxickou aktivitu NK buněk. Mnohem více poznatků o poruše tolerance je získáno v souvislosti s nadměrnou aktivací NK buněk. Ligandy pro NKG2D receptory, jako MICA a MICB proteiny, jsou u celiakie tvořeny střevní sliznicí ve velkém množství. Přítomný IL-15 indukuje NKG2D zprostředkovanou lýzu střevních epiteliálních buněk intraepiteliálními lymfocyty (IELs) nezávislými na T-lymfocytech. Zvýšená tvorba MICA proteinů byla prokázána také na střevních epiteliálních buňkách u Crohnovy choroby a v séru pacientů s RA [75–77].

Byly zaznamenány kvalitativní i kvantitativní změny NK buněk u osob s autoimunitním onemocněním. Ve většině případů bylo prokázáno snížení počtů cirkulujících NK buněk obvykle s paralelně se vyskytující defektní schopností cytotoxicity. Tento defekt vedl k hypotéze, že NK buňky jsou zapojeny do kontroly autoimunitních reakcí. Snížení počtů pak může být následkem chronické aktivace NK buněk spojené s jejich nadměrnou apoptózou. Jako částečné vysvětlení nedostatku NK buněk byla také navržena hypotéza snížené diferenciaci NK buněk z hematopoetických buněk. Pouze malé změny v expresi receptorů NK buněk byly zaznamenány u autoimunitních onemocnění, a jak se zdá, tyto změny nevysvětlují defekty NK buněk [19,78,79].

U diabetu prvního typu byly NK buňky lokalizovány u diagnostikovaných pacientů kolem pankreatických ostrůvků. Ale ve většině případů nebyly nalezeny ve slinivce infiltrované NK buňky *post-mortem* [80,81]. Na základě této informace se odhaduje, že NK buňky se mohou účastnit na destrukci pankreatických beta buněk před tím, než propuknou klinické příznaky diabetes.

U revmatoidní artritidy byly zase prokázány NK buňky infiltrující synoviální hmotu. Tyto NK buňky jsou CD56^{bright} a tvoří více INF-γ než NK buňky cirkulující v krvi pacientů [82]. Kromě toho tyto NK buňky mohou indukovat diferenciaci monocytů v dendritické buňky. NK buňky v tkáních pacientů s RA se vyznačují funkcemi podporujícími onemocnění, ale NK buňky v krvi RA pacientů jsou ve sníženém množství a mají opačnou funkci [19,78].

Dendritické buňky představují antigen-prezentující buňky silně stimulující naivní T-lymfocyty, indukují primární imunitní odpověď a hrají klíčovou roli ve vývoji a udržení T-buněčné tolerance. NK buňky jsou v blízké asociaci s dendritickými buňkami jak v sekundárních lymfatických orgánech, tak v místě zánětu. Dendritické buňky mohou aktivovat NK buňky přímým kontaktem nebo nepřímou díky sekreci cytokinů typu I: INF, IL-12, IL-15, IL-18. Interakce dendritických buněk a NK buněk je oboustranná [83].

Jejich přímý kontakt v přítomnosti lokálních cytokinů může vést ke třem stavům: 1) zabíjení nezralých monocytů odvozených od dendritických buněk (iDCs) zprostředkované NK buňkami, 2) k proliferaci NK buněk indukované dendritickými buňkami přes IL-12, 3) na NK buňkách závislá maturace dendritických buněk. NK buňky mohou rozlišovat mezi myeloidními dendritickými buňkami iDCs, které typicky snižují expresi MHC-I, a zralými dendritickými buňkami, které zvyšují MHC-I expresi v závislosti na antigenu. Zabíjení nezralých iDCs může být chápáno jako kontrola kvality DCs, umožňují pouze zralým DCs migrovat do lymfatických uzlin [84].

Specifita NK buněk v orgánech

Specializované NK buňky lze nalézt v mnoha orgánech, mají různé fenotypy a funkce, které se odvíjí od specifického prostředí daného orgánu.

NK buňky v játrech

Játra jsou orgánem s velkým množstvím imunokompetentních buněk přirozené imunity [85]. U lidí 30–50 % intrahepatálních lymfocytů představují NK buňky [86], zatím-

co u myši tvoří NK buňky přibližně 10–15 %. Počet NK buněk se různí u různých onemocnění jater. Předpokládá se, že NK buňky zastávají různé role pod vlivem různých patologických podmínek [87,88]. Stejně jako NK buňky v periferní krvi i jaterní NK buňky jsou definovány povrchovými znaky CD3⁻CD56⁺, liší se ale absencí exprese markeru CD16 [89,90].

Játra jsou místem tvorby NK buněk během děložního vývoje. Během raných stadií mají hepatální NK buňky všechny typické charakteristiky klasických NK buněk, ale stále vlastní unikátní fenotyp a funkce. U embryonálních a čerstvě narozených myši postrádají NK buňky expresi molekul spojených s maturací NK buněk, jako je membránově-vázaný CD11b, Ly49 receptor, DX5 a intracelulární transkripční faktor Eomes, ovšem vysoce exprimují efektorovou molekulu TRAIL. Jak se ukázalo, tato exprese se kromě jater objevuje i v jiných orgánech, např. slezině [91,92].

Ve srovnání s NK buňkami v periferní krvi a slezině mají hepatální NK buňky vyšší počet granul a exprimují vyšší hodnoty TRAIL, perforinů, granzimu B a ostatních molekul, díky nimž je zprostředkována větší cytotoxická aktivita proti nádorovým buňkám [93]. Získané poznatky tak podporují ideu o protinádorové funkci jaterních NK buněk [94].

NK buňky v reprodukčních orgánech

Během časného těhotenství jsou v decidua basalis přítomné deciduální NK buňky (dNK). Tyto buňky mají jedinečné funkce a fenotyp [95]. Více než 95 % dNK buněk jsou CD56^{bright} CD16^{neg} CD160^{neg} na rozdíl od většiny periferních NK buněk CD16⁺ CD160⁺ podtypu, jejichž fenotyp je specifický ve spojitosti s cytotoxickou funkcí [96,97]. Deciduální dNK buňky exprimují KIR2D receptory ve vyšším počtu nežli periferní NK buňky. Tyto KIR2D receptory rozpoznávají HLA-C molekuly, dominantní KIR ligandy exprimované extravilózním trofoblastem plodu [98].

Lidské dNK buňky zastávají dvě velice zásadní funkce v brzkém těhotenství. Podporují růst cév v deciduu pomocí tvorby cévního endotelilálního růstového faktoru (VEGF) a placentálního růstového faktoru (PlGF) [6,99,100], dále produkují angiopoietin 1, angiopoietin 2 a TGF-β1 [101, 102]. Uvolňování těchto proangiogenních faktorů závisí na vazbě aktivačních receptorů NKp30 a NKp44 s jejich specifickými ligandy přítomnými na stomálních deciduálních buňkách a extravilózním trofoblastu. Bylo také prokázáno, že vazba receptoru KIR2DL4 se specifickým ligandem molekulou HLA-G indukuje produkci proangiogenních citokinů [6,103].

Na rozdíl od periferních NK buněk, pro něž je typická schopnost cytotoxicity, lidské i myšičí deciduální NK buňky prokazují špatnou schopnost zabíjet pro NK buňky klasické cílové buňky [100]. U dNK buněk selhává polarizování mikrotubulů řídících granula obsahující perforiny do synapse při kontaktu s HLA-I molekulou. Ačkoliv mají dNK buňky u normálního těhotenství poruchu plně uskutečnit jejich lytické schopnosti, obsahují perforiny, granzymy a granulosin, což svědčí o tom, že jsou deciduální NK buňky potenciálně schopné cytotoxické aktivity [104]. Různé druhy patogenů, např. lidský cytomegalovirus, HIV-1, HCV či toxoplazma, mohou infikovat decidua basalis a rozšířit se na

plod přes kotevní klky, které jsou v kontaktu s krví matky [103,105–107]. Bylo prokázáno, že dNK buňky plně vykonávají svou cytotoxickou funkci po kontaktu s hCMV infikovanými autologními deciduálními fibroblasty.

Vedle inhibičních KIR, existují další 3 receptory zastávající inhibiční funkci. Jedná se o 2B4, CD94/NKG2A a LILRB1/ILT2. 2B4 receptor je exprimován na všech dNK buňkách, ostatní dva receptory jsou přítomny pouze na podtypech dNK buněk [100,108]. Specifická interakce u lidí mezi inhibičními receptory dNK buněk a jejich ligandy buď molekulami MHC-Ia (HLA-C), nebo molekulami MHC-Ib (HLA-E, HLA-G) hraje důležitou roli. Bylo prokázáno, že vazba CD94/NKG2A inhibičního receptoru spouští silnou inhibici cytotoxické funkce u čerstvě izolovaných dNK buněk z decidua basalis. Na základě této informace se uvažuje, že in situ receptor CD94/NKG2A interagující s molekulou HLA-E exprimující trofoblastem a ostatními deciduálními buňkami je dominantním regulačním mechanismem, který pravděpodobně brání nežádoucí cytotoxicitě proti neinfikovaným buňkám trofoblastu. Dalším inhibičním mechanismem je vazba LILRB1/ILT2 receptoru dNK buněk na HLA-G, která blokuje dNK cytotoxicitu [109,110].

NK buňky a CNS

Za patologického stavu mohou být porušeny bariéry mozku (hematoencefalická a hematolymphová), stávají se pak propustné pro NK buňky [111,112]. Fyziologie NK buněk je modulována probíhajícími cirkadiálními rytmy vlivem neurotransmiterů – např. neuroepinefrinem, který inhibuje cytotoxickou funkci po vazbě s β-adrenergními receptory. Na druhou stranu mohou NK buňky ovlivňovat fyziologii CNS usmrcováním gliových buněk nebo sekrecí INF-γ [113–115]. Nejvíce poznatků o NK buňkách v CNS je získáno ze studií experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE). Výsledky studií jsou dvojího charakteru. Ukázalo se, že funkce NK buněk jsou buď neuroprotektivní, nebo neurotoxické [116,117]. Studie tak opět prokázala, že NK buňky vykazují duální funkce, které byly dříve popsány už u typických autoimunitních nemocí.

Monitorování podtypů NK buněk jakožto náhradních markerů aktivity nemoci, stejně tak jako porozumění mechanismu vstupu NK buněk do mozku a jejich lokální funkce jsou důležitými cíli pro vývoj nových terapeutických postupů na bázi NK buněk [118].

NK buňky, jejich fenotyp a funkční rysy byly studovány mimo jiné u nádorů v mozku, infekcí a neurodegenerativních onemocnění. Co se týče primárních nádorů v mozku, Fadul se svou vědeckou skupinou objevili snížený absolutní počet NK buněk ve vrstvě periferních mononukleárních buněk izolovaných z krve pacientů s glioblastomem (GBM), léčených kombinací ozařovací léčby a temozolomidem [119]. Navíc byla u NK buněk izolovaných od pacientů s GBM prokázána snížená exprese NKG2D. Jako příčina se uvádí zvýšená hladina protizánětlivého faktoru TGF-β v důsledku mozkového nádoru. Vysoké hodnoty tohoto faktoru mohou inhibovat funkci NK buněk a úroveň exprese aktivačního receptoru NKG2D. Tato regulace funkce NK buněk u tumorů v mozku odráží běžné mechanismy úniku ostatních solidních tumorů imunitnímu dohledu [120,121].

Druhou studovanou skupinou představují NK buňky u infekcí CNS. Pouze ve vzácných případech jsou pacienti kompletně postrádající NK buňky extrémně náchylní na herpesvirové infekce [122,123]. U myši byla popsána zásadní účast NK buněk u myši v protiviřové obraně u infekcí mozku myším Theilerovým virem encefalomyelitidy a u myšičího viru hepatitidy [124,125].

U neurodegenerativních onemocnění existují hypotézy podporující myšlenku, že Alzheimerova a Parkinsonova choroba mohou být původně spojené se systematickou imunitorou poruchou [126]. Počet NK buněk u AD se zdá být nepozměněn [127]. Nedávno bylo popsáno, že NK buňky získané od těchto pacientů se vyznačují zvýšenou expresí receptoru 5-HT_{2C} pro neurotransmitter serotonin, který se podílí na snížení či zvýšení cytotoxické aktivity [128–130]. Naopak, pacienti s Parkinsonovou chorobou vykazují zvýšenou expresi inhibičních receptorů NKG2A a nevykazují žádné změny nebo zvýšenou expresi receptoru NKG2D na NK buňkách [131,132]. Jak se ukázalo, cytotoxická aktivita NK buněk u těchto pacientů je buď snižovaná, nebo shodná ve srovnání s kontrolou [133]. Kromě toho studie ex vivo aktivity NK buněk účinkem IL-2 a INF- β vedla k výsledkům snížené cytotoxické aktivity NK buněk u pacientů ve srovnání s kontrolními dárci.

Závěr

Doposud získaná data ukazují, že NK buňky hrají důležitou roli v reprodukci, kontrole brzkých stadií parazitárních, virových onemocnění (herpesviry, poxviry, influenza, HIV-1) a onkologických procesů. Jejich modulace může vést k novým přístupům v léčbě autoimunitních chorob, astmatu a zmírnit komplikace po transplantacích kostní dřeně. Stále nejsou objasněny mnohé vzájemné interakce receptorů NK buněk s jejich ligandy, a proto je velmi důležité a potřebné pokračovat ve studiích, které pomáhají pochopit interakce jednotlivých molekul s receptory NK buněk. Velmi málo se ví o distribuci NK buněk v lidském organismu, jejich vývoji, paměti, ale i molekulárních základech NK buněčné tolerance. Nicméně víme, že působení NK buněk v lidském organismu je velmi komplexní, a proto je třeba vyvíjet nové přístupy pro jejich studium a další porozumění jejich funkcím a mechanismům působení. Imunoterapie pomocí změny exprese jejich povrchových receptorů či změny vazeb ligandů, úprava senzitivity cílových buněk vůči apoptóze zprostředkované NK buňkami představují možné cesty.

Práce byla podpořena grantem MŠMT LH11019.

Literatura

- Bostik P, Takahashi Y, Mayne AE, Ansari AA. Innate immune natural killer cells and their role in HIV and SIV infection. *HIV therapy*. 2010;4(4):483–504.
- Ritz J, Schmidt RE, Michon J, Hercend T, Schlossman SF. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Advances in immunology*. 1988;42:181–211.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology*. 2001;22(11):633–640.
- Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101(8):3052–3057.

- Bradley TP, Bonavida B. Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. IV. Natural killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity can be mediated by the same human effector cell as determined by the two-target conjugate assay. *Journal of immunology*. 1982;129(5):2260–2265.
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine*. 2006;12(9):1065–1074.
- Cella M, Fuchs A, Vermi W, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*. 2009;457(7230):722–725.
- Abo T, Balch CM. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *Journal of immunology*. 1981;127(3):1024–1029.
- Abo T, Cooper MD, Balch CM. Characterization of HNK-1+ (Leu-7) human lymphocytes. I. Two distinct phenotypes of human NK cells with different cytotoxic capability. *Journal of immunology*. 1982;129(4):1752–1757.
- Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *Journal of immunology*. 1983;131(4):1789–1796.
- Manara GC, Ferrari C, De Panfilis G. HNK-1 antigen is not specific for natural killer cells. *J Invest Dermatol*. 1988;91(4):374–375.
- Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*. 2010;116(19):3853–3864.
- Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010;116(19):3865–3874.
- Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol*. 2012;24(5):331–341.
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235–271.
- Bubenik J. MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review). *International journal of oncology*. 2004;25(2):487–491.
- Menard C, Blay JY, Borg C, et al. Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. *Cancer research*. 2009;69(8):3563–3569.
- Nielsen CM, White MJ, Goodier MR, Riley EM. Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Front Immunol*. 2013;4:422.
- Aramaki T, Ida H, Izumi Y, et al. A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2009;19(3):245–252.
- Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, et al. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 1998;86(2):123–133.
- Takahashi K, Miyake S, Kondo T, et al. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(5):R23–29.
- Foley B, Cooley S, Verneris MR, et al. Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen. *Journal of immunology*. 2012;189(10):5082–5088.
- Gratama JW, Kluin-Nelemans HC, Langelaar RA, et al. Flow cytometric and morphologic studies of HNK1+ (Leu 7+) lymphocytes in relation to cytomegalovirus carrier status. *Clin Exp Immunol*. 1988;74(2):190–195.
- Cella M, Miller H, Song C. Beyond NK cells: the expanding universe of innate lymphoid cells. *Front Immunol*. 2014;5:282.
- Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(10):645–657.
- Bernink JH, Peters CP, Munneke M, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol*. 2013;14(3):221–229.
- Fuchs A, Vermi W, Lee JS, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity*. 2013;38(4):769–781.
- Moro K, Yamada T, Tanabe M, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 2010;463(7280):540–544.
- Turner JE, Morrison PJ, Wilhelm C, et al. IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(13):2951–2965.
- Halim TY, Krauss RH, Sun AC, Takei F. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*. 2012;36(3):451–463.
- Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, et al. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(34):13921–13926.
- Chang YJ, Kim HY, Albacker LA, et al. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2011;12(7):631–638.
- Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1045–1054.
- Walker JA, McKenzie AN. Development and function of group 2 innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(2):148–155.

35. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity*. 2008;29(6):947–957.
36. Buonocore S, Ahern PP, Uhlir HH, et al. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*. 2010;464(7293):1371–1375.
37. Mebius RE, Streeter PR, Michie S, Butcher EC, Weissman IL. A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4+ CD3- cells to colonize lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(20):11019–11024.
38. Cella M, Otero K, Colonna M. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1beta reveals intrinsic functional plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(24):10961–10966.
39. Hughes T, Becknell B, Freud AG, et al. Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue. *Immunity*. 2010;32(6):803–814.
40. Bonaparte MI, Barker E. Killing of human immunodeficiency virus-infected primary T-cell blasts by autologous natural killer cells is dependent on the ability of the virus to alter the expression of major histocompatibility complex class I molecules. *Blood*. 2004;104(7):2087–2094.
41. Mocikat R, Braumuller H, Gumy A, et al. Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*. 2003;19(4):561–569.
42. Liu Q, Sun Y, Rihn S, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors restore impaired NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology*. 2009;83(17):8705–8712.
43. Kottilil S. Natural killer cells in HIV-1 infection: role of NK cell-mediated non-cytolytic mechanisms in pathogenesis of HIV-1 infection. *Indian journal of experimental biology*. 2003;41(11):1219–1225.
44. Mantegani P, Tambussi G, Galli L, Din CT, Lazzarin A, Fortis C. Perturbation of the natural killer cell compartment during primary human immunodeficiency virus 1 infection primarily involving the CD56 bright subset. *Immunology*. 2010;129(2):220–233.
45. De Maria A, Fogli M, Costa P, et al. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *European journal of immunology*. 2003;33(9):2410–2418.
46. Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, et al. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(25):15011–15016.
47. Flores-Villanueva PO, Yunis EJ, Delgado JC, et al. Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(9):5140–5145.
48. Gao X, Nelson GW, Karacki P, et al. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *The New England journal of medicine*. 2001;344(22):1668–1675.
49. Nossner E, Goldberg JE, Nafziger C, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. HLA-derived peptides which inhibit T cell function bind to members of the heat-shock protein 70 family. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(2):339–348.
50. Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nature genetics*. 2002;31(4):429–434.
51. Merino A, Malhotra R, Morton M, et al. Impact of a functional KIR2DS4 allele on heterosexual HIV-1 transmission among discordant Zambian couples. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(4):487–495.
52. Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007;370(9599):1644–1652.
53. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, et al. Human immune responses to dengue viruses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1990;21(4):658–662.
54. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Archives of medical research*. 2005;36(5):425–435.
55. Chau TN, Quyen NT, Thuy TT, et al. Dengue in Vietnamese infants – results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(4):516–524.
56. Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases*. 1999;180(5):1429–1435.
57. Homchampa P, Sarasombath S, Suvatte V, Vongskul M. Natural killer cells in dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 1988;6(2):95–102.
58. Wahid SF, Sanusi S, Zawawi MM, Ali RA. A comparison of the pattern of liver involvement in dengue hemorrhagic fever with classic dengue fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2000;31(2):259–263.
59. Guabiraba R, Besnard AG, Marques RE, et al. IL-22 modulates IL-17A production and controls inflammation and tissue damage in experimental dengue infection. *European journal of immunology*. 2013;43(6):1529–1544.
60. Renneson J, Guabiraba R, Maillet I, et al. A detrimental role for invariant natural killer T cells in the pathogenesis of experimental dengue virus infection. *The American journal of pathology*. 2011;179(4):1872–1883.
61. Fagundes CT, Costa VV, Cisalpino D, et al. IFN-gamma production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(12):e1449.
62. Suwannasaen D, Romphruk A, Leelayuwat C, Lertmongkolchai G. Bystander T cells in human immune responses to dengue antigens. *BMC Immunol*. 2010;11:47.
63. Kurane I, Hebblewhite D, Ennis FA. Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. *Immunology*. 1986;58(3):429–436.
64. Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(8):1108–1116.
65. Hershkovitz O, Rosental B, Rosenberg LA, et al. NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *Journal of immunology*. 2009;183(4):2610–2621.
66. Shmerling RH. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus – there before you know it. *The New England journal of medicine*. 2003;349(16):1499–1500.
67. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J*. 2004;23(2):255–259.
68. Middleton D, Meenagh A, Moscoso J, Arnaiz-Villena A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue Antigens*. 2008;71(2):105–113.
69. Martin MP, Nelson G, Lee JH, et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *Journal of immunology*. 2002;169(6):2818–2822.
70. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, et al. heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *Journal of immunology*. 2004;173(7):4273–4276.
71. van der Slik AR, Alizadeh BZ, Koeleman BP, Roep BO, Giphart MJ. Modelling KIR-HLA genotype disparities in type 1 diabetes. *Tissue Antigens*. 2007;69 Suppl 1: 101–105.
72. Momot T, Koch S, Hunzelmann N, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2004;50(5):1561–1565.
73. Pellett F, Siannis F, Vukin I, Lee P, Urowitz MB, Gladman DD. KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma. *Tissue Antigens*. 2007;69 Suppl 1:106–108.
74. Moins-Teisserenc HT, Gadola SD, Cella M, et al. Association of a syndrome resembling Wegener's granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules. *Lancet*. 1999;354(9190):1598–1603.
75. Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 2004;21(3):367–377.
76. Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*. 2003;125(3):730–745.
77. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*. 2004;21(3):357–366.
78. Park YW, Kee SJ, Cho YN, et al. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009;60(6):1753–1763.
79. Yabuhara A, Yang FC, Nakazawa T, et al. A killing defect of natural killer cells as an underlying immunologic abnormality in childhood systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1996;23(1):171–177.
80. Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(12):5115–5120.
81. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(2):173–181.
82. Dalbeth N, Callan MF. A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis Rheum*. 2002;46(7):1763–1772.
83. Lunemann A, Lunemann JD, Munz C. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med*. 2009;15(9–10):352–358.
84. Della Chiesa M, Vitale M, Carlomagno S, Ferlazzo G, Moretta L, Moretta A. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *European journal of immunology*. 2003;33(6):1657–1666.
85. Kita H, Mackay IR, Van De Water J, Gershwin ME. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1485–1501.
86. Yamagawa S, Kamimura H, Ichida T. Natural killer cell receptors and their ligands in liver diseases. *Med Mol Morphol*. 2009;42(1):1–8.
87. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(6):1915–1919.
88. Salazar-Mather TP, Orange JS, Biron CA. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(1):1–14.
89. Hata K, Zhang XR, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Herberman RB, Whiteside TL. Isolation, phenotyping, and functional analysis of lymphocytes from human liver. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990;56(3):401–419.

90. Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators of inflammation*. 2012;2012:949157.
91. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, et al. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity*. 2012; 36(1):55–67.
92. Takeda K, Cretney E, Hayakawa Y, et al. TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood*. 2005;105(5):2082–2089.
93. Ishiyama K, Ohdan H, Ohira M, Mitsuta H, Arihiro K, Asahara T. Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. *Hepatology*. 2006;43(2):362–372.
94. Subleski JJ, Hall VL, Back TC, Ortaldo JR, Wiltrout RH. Enhanced antitumor response by divergent modulation of natural killer and natural killer T cells in the liver. *Cancer research*. 2006;66(22):11005–11012.
95. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta*. 2008;29 Suppl A:S60–66.
96. Le Bouteiller P, Barakonyi A, Giustiniani J, et al. Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(26):16963–16968.
97. Le Bouteiller P, Tabiasco J, Polgar B, et al. CD160: a unique activating NK cell receptor. *Immunology letters*. 2011;138(2):93–96.
98. Male V, Sharkey A, Masters L, Kennedy PR, Farrell LE, Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *European journal of immunology*. 2011;41(10):3017–3027.
99. Kalkunte SS, Mselle TF, Norris WE, Wira CR, Sentman CL, Sharma S. Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *Journal of immunology*. 2009;182(7):4085–4092.
100. Vacca P, Moretta L, Moretta A, Mingari MC. Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy. *Trends in immunology*. 2011; 32(11):517–523.
101. Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM, et al. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *Journal of immunology*. 2013;190(8):3939–3948.
102. Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol*. 2006; 80(3):572–580.
103. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppasamy SP, et al. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol*. 2006;4(1):e9.
104. Veljkovic Vujaklija D, Dominovic M, Gulic T, et al. Granulysin expression and the interplay of granulysin and perforin at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol*. 2013;97(2):186–196.
105. Hurtado CW, Golden-Mason L, Brocato M, Krull M, Narkewicz MR, Rosen HR. Innate immune function in placenta and cord blood of hepatitis C – seropositive mother-infant dyads. *PLoS one*. 2010;5(8):e12232.
106. Le Bouteiller P, Solier C, Proll J, Aguerre-Girr M, Fournel S, Lenfant F. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update*. 1999;5(3):223–233.
107. Marlin R, Nugeyre MT, Duriez M, Cannou C, Le Breton A, et al. Decidual soluble factors participate in the control of HIV-1 infection at the maternofetal interface. *Retrovirology*. 2011;8:58.
108. El Costa H, Casemayou A, Aguerre-Girr M, et al. Critical and differential roles of NKP46- and NKP30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *Journal of immunology*. 2008;181(5):3009–3017.
109. Favier B, Lemaoult J, Lesport E, Carosella ED. ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse. *FASEB J*. 2010;24(3):689–699.
110. Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty DE, Lopez-Botet M. The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *European journal of immunology*. 1999;29(1):277–283.
111. Alsharifi M, Lobigs M, Simon MM, et al. NK cell-mediated immunopathology during an acute viral infection of the CNS. *European journal of immunology*. 2006;36(4):887–896.
112. Domingues PH, Teodosio C, Ortiz J, et al. Immunophenotypic identification and characterization of tumor cells and infiltrating cell populations in meningiomas. *The American journal of pathology*. 2012;181(5):1749–1761.
113. Logan RW, Arjona A, Sarkar DK. Role of sympathetic nervous system in the entrainment of circadian natural-killer cell function. *Brain Behav Immun*. 2011; 25(1):101–109.
114. Lunemann A, Lunemann JD, Roberts S, et al. Human NK cells kill resting but not activated microglia via NKG2D- and NKP46-mediated recognition. *Journal of immunology*. 2008;181(9):6170–6177.
115. Walter J, Honsek SD, Illes S, et al. A new role for interferon gamma in neural stem/precursor cell dysregulation. *Mol Neurodegener*. 2011;6:18.
116. Hao J, Liu R, Piao W, Zhou Q, et al. Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(9):1907–1921.
117. Winkler-Pickett R, Young HA, Cherry JM, et al. In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses. *Journal of immunology*. 2008;180(7):4495–4506.
118. Poli A, Kmiecik J, Domingues O, Hentges F, et al. NK cells in central nervous system disorders. *Journal of immunology*. 2013;190(11):5355–5362.
119. Fadul CE, Fisher JL, Gui J, Hampton TH, Cote AL, Ernstoff MS. Immune modulation effects of concomitant temozolomide and radiation therapy on peripheral blood mononuclear cells in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol*. 2011;13(4):393–400.
120. Crane CA, Han SJ, Barry JJ, Ahn BJ, Lanier LL, Parsa AT. TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. *Neuro Oncol*. 2010;12(1):7–13.
121. Groth A, Kloss S, von Strandmann EP, Koehl U, Koch J. Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance. *J Innate Immun*. 2011;3(4):344–354.
122. Almerigogna F, Fassio F, Giudizi MG, et al. Natural killer cell deficiencies in a consecutive series of children with herpetic encephalitis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(1):231–238.
123. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine*. 1989; 320(26):1731–1735.
124. Paya CV, Patick AK, Leibson PJ, Rodriguez M. Role of natural killer cells as immune effectors in encephalitis and demyelination induced by Theiler's virus. *Journal of immunology*. 1989;143(1):95–102.
125. Walsh KB, Edwards RA, Romero KM, Kotljachik MV, Stohlman SA, Lane TE. Expression of CXC chemokine ligand 10 from the mouse hepatitis virus genome results in protection from viral-induced neurological and liver disease. *Journal of immunology*. 2007;179(2):1155–1165.
126. Pellicano M, Larbi A, Goldeck D, et al. Immune profiling of Alzheimer patients. *Journal of neuroimmunology*. 2012;242(1–2):52–59.
127. Speciale L, Calabrese E, Saresella M, et al. Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*. 2007; 28(8):1163–1169.
128. Hellstrand K, Hermodsson S. Role of serotonin in the regulation of human natural killer cell cytotoxicity. *Journal of immunology*. 1987;139(3):869–875.
129. Martins LC, Rocha NP, Torres KC, et al. Disease-specific expression of the serotonin-receptor 5-HT(2C) in natural killer cells in Alzheimer's dementia. *Journal of neuroimmunology*. 2012;251(1–2):73–79.
130. Olah T, Ocsovszki I, Mandi Y, Pusztai R, Bakay M, Balint E. Opposite effects of serotonin and interferon-alpha on the membrane potential and function of human natural killer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2005;41(5–6):165–170.
131. Mihara T, Nakashima M, Kuroiwa A, et al. Natural killer cells of Parkinson's disease patients are set up for activation: a possible role for innate immunity in the pathogenesis of this disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008;14(1):46–51.
132. Niwa F, Kuriyama N, Nakagawa M, Imanishi J. Effects of peripheral lymphocyte subpopulations and the clinical correlation with Parkinson's disease. *Geriatr Gerontol Int*. 2012;12(1):102–107.
133. Solerte SB, Fioravanti M, Pascale A, Ferrari E, Govoni S, Battaini F. Increased natural killer cell cytotoxicity in Alzheimer's disease may involve protein kinase C dysregulation. *Neurobiol Aging*. 1998;19(3):191–199.

Využití metody MALDI-TOF MS k přímé identifikaci bakterií z klinického materiálu

R. TARABOVÁ¹, J. BARDOŇ^{1,2}

¹Ústav mikrobiologie, LF UP v Olomouci a FN Olomouc,
²Státní veterinární ústav, Olomouc, NRL pro kampylobaktery

SOUHRN

Tarabová R., Bardoň J.: **Využití metody MALDI-TOF MS k přímé identifikaci bakterií z klinického materiálu**

MALDI-TOF MS je metoda umožňující rychlou identifikaci bakterií. Ta je mimo jiné důležitá pro včasné zahájení adekvátní antibiotické terapie u pacientů s infekcí. V tomto přehledovém článku jsou popsány různé metody přímé detekce bakterií z klinického materiálu. Stěžejní část se zabývá přímou identifikací bakterií z pozitivních hemokultur. Pozornost je věnována také identifikaci bakterií z moči a mozkomíšního moku. Stručně jsou zmíněny spolehlivosti jednotlivých metod v porovnání s konvenčními metodami.

Klíčová slova: infekce, přímá identifikace bakterií, MALDI-TOF MS, hemokultura, moč, mozkomíšní mok

SUMMARY

Tarabová R., Bardoň J.: **The use of MALDI-TOF MS for direct identification of bacteria in clinical specimens**

MALDI-TOF MS is a method enabling rapid identification of bacteria. This is also important for early initiation of adequate antibiotic therapy in patients with infections. In this review, various methods for direct detection of bacteria in clinical specimens are described. The fundamental part deals with direct identification of bacteria from positive blood cultures. Attention is also paid to identification of bacteria from urine and cerebrospinal fluid. Finally, reliability of the methods is mentioned in comparison with conventional methods.

Keywords: infection, direct identification of bacteria, MALDI-TOF MS, blood culture, urine, cerebrospinal fluid

Klin mikrobiol inf lék 2016;22(3):161–165

Adresa: MVDr. Radka Tarabová, Ústav mikrobiologie LF UP v Olomouci a FN Olomouc, I. P. Pavlova 185/6, 779 00 Olomouc, email: radka.tarabova@gmail.com

Došlo do redakce: 21. 10. 2016

Přijato k tisku: 5. 12. 2016

Úvod

MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) je laboratorní metoda, která umožňuje rychlou identifikaci grampozitivních i gramnegativních bakterií, případně dalších mikroorganismů na úrovni rodu a druhu srovnáváním spektra získaného měřením hmotnostních spekter proteinů a jiných bakteriálních komponent [1]. V několika posledních letech se MALDI-TOF MS ukázala jako výborná metoda pro identifikaci bakterií. Tato metoda patří mezi spolehlivé, časově úsporné a provozně relativně levné identifikační metody v případě, že pomineme vysokou vstupní investici na pořízení přístroje. Limitací této technologie je zejména dostupnost kvalitní databáze, protože identifikace nových izolátů je možná pouze tehdy, obsahuje-li databáze hmotnostní spektrum proteomu daného izolátu [2]. Mezi hlavní výrobce identifikačních přístrojů na bázi MALDI-TOF MS patří

firmy Bruker a Shimadzu. U přístrojů firmy Bruker vyjadřuje míru spolehlivosti identifikace tzv. identifikační skóre. Je-li skóre $\geq 2,0$, jedná se o identifikaci na úrovni druhu. Je-li skóre $\geq 1,7$, jedná se o identifikaci na úrovni rodu. U přístrojů firmy Shimadzu jsou výsledky vyjádřeny v procentech a odráží podobnost vzorku s tzv. SuperSpektrém, které je odvozeno z několika referenčních spekter odlišných kmenů stejných druhů. Za spolehlivou se považuje identifikace s výsledkem v rozmezí 75 až 99,9 % [3]. Není-li možné získat výsledek s pomocí SuperSpektra, je daný vzorek porovnán s referenčními spektry databáze. Několik publikací popisuje nižší hranici spolehlivosti identifikace, a to 70 % [4], 50 % [5], nebo dokonce 40 % [3]. Rychlá identifikace původce je nutná k zahájení adekvátní antibiotické terapie. Příchod metody MALDI-TOF MS pro rychlou diagnostiku patogenů znamenal zásadní průlom v mikrobiologii. V poslední době se tato metoda v kombinaci s extrakčními me-

today používá k identifikaci patogenů přímo z tělních tekutin, zejména z pozitivních hemokultur [6].

Přímá identifikace bakterií z hemokultury

Sepse je jednou z hlavních příčin úmrtí s odhadovanou incidencí až 19 milionů lidí ročně na celém světě [7]. Zahájení vhodné antibiotické terapie je důležitým bodem kontroly infekce, neboť šance na přežití u neléčených pacientů se sepsí klesá s každou hodinou [8]. Vlek a kol. ve své studii popsali, že s pomocí přímé identifikace pozitivních hemokultur využitím MALDI-TOF MS došlo ke zkrácení času potřebného k určení druhu mikroorganismu o 28,8 hodin a současně došlo ke zvýšení procenta pacientů o 11,3 %, kteří do 24 hodin dostali vhodnou antibiotickou terapii [9].

Hemokultury jsou nedílnou součástí materiálu pro laboratorní průkaz původce sepse. Pro identifikaci příčiny sepse se doporučuje odebrat venepunkcí před nasazením antibiotické terapie alespoň 2 sady hemokultur (aerobní a anaerobní vzorek) [10]. Ačkoliv jen 30–60 % hemokultur odebraných od pacientů se sepsí je pozitivních [11,12], patří tato metoda stále mezi ty nejlepší pro průkaz původce sepse [10]. Čas pro získání pozitivního nálezu se liší v závislosti na druhu patogenu, rychlosti jeho množení, množství odebrané krve, přítomnosti polymikrobiální infekce či nasazení antibiotické terapie před získáním hemokultury a pohybuje se od několika hodin až po několik dní. Medián doby pro dosažení pozitivní hemokultury je kolem 15 hodin [13,14]. Hemokultura je podrobena barvení dle Grama [15]. Dále je obvykle přes noc nebo i déle prováděna kultivace na živných médiích. Identifikace pomocí biochemických testů, automatizovaných systémů jako je VITEK 2 (BioMérieux, Francie) nebo Phoenix (Becton Dickinson, USA) trvá minimálně 6 až 8 hodin, ale kompletní identifikace vzácných mikroorganismů trvá obvykle déle než 72 hodin u bakterií a více než 60 hodin u hub [13,14]. Přímá identifikace mikroorganismů z pozitivních hemokultur tak umožňuje rychlejší diagnostiku (12–24 h) a může tak významně ovlivnit léčbu pacientů se sepsí [15–18].

Christner a kol. nedávno uvedli, že při identifikaci mikroorganismů v hemokultuře pomocí MALDI-TOF MS je vyžadována pro získání dostatečného profilu koncentrace $> 10^6$ CFU/ml. Při experimentech, kde byla v hemokultuře koncentrace mikroorganismu $> 10^8$, byla hmotnostní spektra velmi podobná spektrům z čistých agarových kultur. Identifikační skóre ze vzorků s 10^7 CFU/ml byla signifikantně nižší oproti těm z agarových kultur, ale stále bylo možné mikroorganismus určit. Při 10^6 CFU/ml začala být spektra nerozeznatelná a začaly se objevovat nesprávné identifikace společně s nízkým identifikačním skóre $< 1,5$ v důsledku svévolného párování nebakteriálních piků. Christner a kol. dále popsali na základě několika náhodně vybraných vzorků, že v době pozitivní hemokultury se pohybuje bakteriální koncentrace v rozmezí 2×10^7 a 7×10^9 CFU/ml (median, 5×10^8 CFU/ml) [17].

Morgenthaler a Kostrzewa ve svém přehledovém článku věnovali pozornost hemokultivačním lahvičkám, které byly použity pro přímou identifikaci patogenu z hemokultury. Pro většinu studií byly použity hemokultivační lahvičky Bactec (BD Diagnostics, Sparks, USA), pro čtvrtinu prací

hemokultivační lahvičky BacT/Alert (Biomérieux, Nürtingen, Německo) a jen dvě studie z 21 použily jiného výrobce (VersaTREK, TREK Diagnostic Systems, Cleveland) [6,19,20]. Práce, ve kterých byly použity Bactec hemokultivační lahvičky, vykazovaly vyšší úspěšnost identifikace původce oproti studiím, kde byly použity BacT/Alert lahvičky. Problémy s identifikací bakteriálního patogenu při použití BacT/Alert hemokultivačních lahviček obsahujících uhlí byly zaznamenány i v několika dalších studiích [21–23]. Při použití anaerobních BacT/Alert hemokultivačních lahviček zaznamenala jedna práce [24] potíže při identifikaci patogenu, zatímco v jiné studii [25] byly získány spolehlivé výsledky. Většina studií [9,26–29] zaznamenala lepší výsledky přímé identifikace u gramnegativních mikroorganismů oproti mikroorganismům grampozitivním.

Během několika posledních let byly vyvinuty různé metody pro přímou diagnostiku patogenů z pozitivní hemokultury. Tyto metody se liší ve svém přístupu k odstranění buněčných složek. Ferroni a kol. využili ve své práci saponin a kyselinu trifluoroctovou. Saponin rozpouští krevní buňky a uvolňuje případné intracelulární patogeny, ale nenarušuje mikrobiální membránu [18]. Jiná práce popisuje lýzu krevních buněk za použití chloridu amonného [27]. V práci Prod'homme a kol. bylo dosaženo spolehlivé identifikace v 78,7 % všech testovaných pelet a 99 % identifikací bylo identifikováno na úrovni druhu. Analýza pomocí MALDI-TOF MS byla provedena přímo z bakteriální pelety nebo až po další extrakci proteinu [30].

Oddělení mikroorganismů od krevních buněk může být provedeno centrifugací a zkumavkami se separačním gelem [16,31]. Stevenson a kol. ve své studii neidentifikovali 19,8 % izolátů, důvodem bylo zejména nedostatečné množství bakterií v hemokultuře. Skóre $\geq 1,7$ bylo dosaženo u 95,3 % vzorků. Všechny 8 izolátů *Streptococcus mitis* bylo mylně identifikováno jako *Streptococcus pneumoniae*. Vzorky pozitivní hemokultury byly napipetovány do zkumavky na separaci séra s aktivátorem srážení a bylo provedeno pět promývacích/centrifugačních kroků pro odstranění krevních buněk a proteinů z hemokultury. Došlo k vytvoření malé, na povrchu gelu viditelné pelety bakterií. Většina krevních buněk byla pod gelovou vrstvou. Byla odstraněna téměř všechna tekutina, s výjimkou zhruba 500 μ l, které byly použity pro jemnou resuspendaci bakteriální pelety bez narušení vrstvy gelu. V případě lýzy krevních buněk a jejich přetrvání na vrstvě gelu, byla odstraněna veškerá tekutina a bakterie byly resuspendovány v 500 μ l trypsin sojovém agaru. Následovala centrifugace pro získání pelety se zbývajícími krevními buňkami. Bakteriální peleta byla resuspendována v lyzačním roztoku. Bakteriální buňky byly dále centrifugovány, ošetřeny kyselinou mravenčí a následně acetonitrilem. Poté byl vzorek nanášen na kovovou MALDI destičku a opatrně smíchan s matricí [31].

Moussaoui a kol. použili pro separaci krevních buněk, séra a bakterií také zkumavku se separačním gelem, která umožňuje o něco jednodušší separační postup. Získaná bakteriální peleta byla zpracována standardní extrakcí proteinů etanolem/kyselinou mravenčí. Touto separační metodou bylo identifikováno 91,08 % gramnegativních bakterií a 89,02 % grampozitivních bakterií na úrovni druhu. Ve většině polymikrobiálních vzorků byl identifikován alespoň jeden z vy-

skytujících se druhů (80,9 %). Šest izolátů *Streptococcus mitis* bylo mylně identifikováno jako *Streptococcus pneumoniae* [16].

La Scola a Raoult ve své publikaci uvádí, že MALDI-TOF MS je vhodná metoda pro přímou identifikaci bakteriálních izolátů v hemokulturách, s výjimkou viridujících streptokoků a polymikrobiálních vzorků, kde se podařila identifikaci pouze jednoho druhu. Výše uvedení autoři v této studii použili 2 odlišné protokoly přípravy hemokultury, které zahrnovaly postupné odstředování a lýzu kyselinou trifluoroctovou nebo kyselinou mravenčí. U monomikrobiálních vzorků bylo správně identifikováno 66 %. Změna protokolu z kyseliny trifluoroctové na kyselinu mravenčí zlepšila identifikaci staphylokoků z 59 % na 76 % [15].

V současné době existuje několik publikací popisujících extrakci bakteriálního proteinu z pozitivní hemokultury. Většina z těchto publikací zahrnuje vlastní metody používané v dané laboratoři, tyto metody ale nebyly dále validovány pro klinické rutinní použití [6]. Pro přímou identifikaci mikroorganismů z hemokultury lze užít metodu ICM (intact cell method), kdy se centrifugují 4 ml krve (oddělení krevních buněk). Vzniklý supernatant se dále centrifuguje při 15 500 otáčkách/min pro oddělení bakterií. Získaná peleta se jednou propláchnou neionizovanou vodou a materiál se opět centrifuguje. Na kovovou destičku MALDI se nanese malé množství sedimentu, nechá se uschnout na vzduchu při pokojové teplotě a poté se převrství 1 μ l roztoku matrice, nechá se zaschnout a provádí se identifikace [32]. Metoda ICM přináší spolehlivé výsledky cca u poloviny vzorků hemokultur, v 49 % došlo k určení na úrovni druhu, v 51 % k určení na úrovni rodu. Je to tedy dobrá iniciální metoda a v případě, že nedojde ke spolehlivému určení mikroorganismu, je nutné pokračovat v identifikaci metodou PEM (protein extraction method) [32].

Postup u metody PEM je ze začátku shodný jako u metody ICM. Peleta, která se u metody ICM nanáší na destičku, se u metody PEM resuspenduje ve vodě, dále se přidá absolutní etanol a směs se centrifuguje. Poté se odstraní supernatant a k peletě se přidá kyselina mravenčí, vše se promíchá a následně se přidá acetonitril. Směs se opět centrifuguje a nanáší na kovovou destičku MALDI, po uschnutí na vzduchu při pokojové teplotě se převrství roztokem matrice a nechá se zaschnout [32].

Komerční Sepsityper kit (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Německo) představuje metodu přípravy vzorku, která umožňuje izolaci bakterií nebo hub z pozitivní hemokultury. Tato metoda zahrnuje lýzu krevních buněk, centrifugaci a promývání vzorku tak, že na konci je získána peleta bakterie nebo houby, která je dále zpracována standardními metodami pro identifikaci s pomocí MALDI-TOF MS [33].

Morgenthaler a Kostrzewa ve své práci shrnuli data z 21 studií pracujících s komerčním kitem Sepsityper. Z výstupů vyplývá, že v 80 % byly získány spolehlivé výsledky na úrovni druhu, větší spolehlivost byla u gramnegativních bakterií (90 %), ve srovnání s grampozitivními bakteriemi (76 %) nebo kvasinkami (66 %). Nebyly známy žádné nesprávné identifikace na úrovni rodu při skóre 1,6 [6]. Některé práce se zabývaly také identifikačním skóre, kterého bylo ve studiích při přímé identifikaci patogenu z pozi-

itivní hemokultury pomocí Sepsityper kitu dosaženo. V několika případech byly akceptovány nižší hodnoty identifikačního skóre pro diagnostiku na úrovni druhu a rodu. V některých studiích autoři použili pro identifikaci na úrovni druhu skóre > 1,8 a pro identifikaci na úrovni rodu skóre > 1,6 [19,20,25]. Saffert a kol. použili pro identifikaci na úrovni druhu skóre > 1,7 a skóre > 1,5 pro identifikaci na úrovni rodu [34]. Stejnou hodnotu identifikačního skóre pro identifikaci na úrovni druhu, tedy > 1,7, použili také autoři dalších prací [21,35,36]. V některých případech byla aplikována ještě nižší hodnota skóre pro identifikaci na úrovni druhu a to > 1,6 [37] a > 1,5 [33,38]. Tyto nižší hodnoty byly ve výše zmíněných člancích obecně považovány za spolehlivé a jen v několika málo případech vedly k falešně pozitivním identifikacím na úrovni druhu [6]. Na základě publikovaných článků má odněkdy software MALDI Biotyper ve verzi MBT compass pro Sepsityper kit skóre 1,6 pro pozitivní identifikaci mikroorganismů [6]. Navíc došlo k určitému zlepšení databáze, např. k diferenciaci *Streptococcus pneumoniae* od jiných streptokoků nebo *Staphylococcus aureus* od jiných stafylokoků [6].

Juiz a kol. ve své publikaci při přímé identifikaci grampozitivních koků z Bactec pozitivních lahví dokonce zaznamenali lepší výsledky při použití komerční metody Sepsityper kit oproti tzv. in-house metodě, která se používá v jejich laboratoři. Při přímé identifikaci gramnegativních bakterií v této studii však nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi oběma metodami [29]. Kok a kol. ve své práci, která zahrnovala 507 vzorků (21 polymikrobiálních, 358 monomikrobiálních – 195 grampozitivních a 163 gramnegativních), identifikovali pomocí Sepsityper kitu z monomikrobiálních hemokultur 100 % grampozitivních vzorků na úrovni rodu a 67,7 % na úrovni druhu a 100 % gramnegativních mikroorganismů na úrovni rodu a 91,4 % na úrovni druhu. Skóre < 1,7 v této studii mělo 25,2 % pozitivních hemokultur, které zahrnovaly 31,6 % grampozitivních a 32,3 % polymikrobiálních hemokultur. Pět hemokultur bylo nesprávně identifikováno, ale jen v rámci druhu, jednalo se o 4 monomikrobiální kultury se *Streptococcus oralis/mitis*, který byl identifikován jako *Streptococcus pneumoniae* [28].

Přímá identifikace bakterií z moči

Ferreira a kol. popsali metodu vhodnou pro přímou identifikaci bakterií z moči. Jedná se o metodu ICM a PEM popsanou podrobněji u hemokultur. Vzorky moči byly v této práci nejprve označeny jako pozitivní na základě analýzy přístrojem, který využívá technologie fluorescenční průtokové cytometrie (UF-1000i, BioMerieux, Francie). Dle výsledků této publikace je u přímé diagnostiky mikroorganismů z moči dostačující metoda ICM, která je účinná v 97 % případů, poskytuje téměř shodné výsledky jako metoda PEM a její další výhodou je bezesporu úspora času a omezení manipulace se vzorkem. Výše uvedení autoři dále konstatovali, že množství bakterií ve vzorku hraje důležitou roli při dosažení spolehlivého výsledku. Obsahoval-li vzorek moči bakteriální koncentraci > 10⁵ CFU/ml, byla korelace s konvenčními metodami 91,8 % na úrovni druhu a 92,7 % na úrovni rodu [32]. Některé publikace uvádí, že počet mi-

kroorganizmů potřebných pro identifikaci je závislý i na druhu bakterií, např. v případě *Enterococcus faecalis* musí být množství bakterií $> 5 \times 10^5$ CFU/ml [39]. Köhling a kol. uvádějí, že MALDI-TOF MS umožňuje spolehlivou přímou identifikaci bakterií z moči při koncentracích 10^3 CFU/ml [40].

Přímá identifikace bakterií z mozkomíšního moku

Segawa a kol. popsali přímou identifikaci bakteriálního původce v cerebrospinálním moku u pacientky s bakteriální meningitidou způsobenou *Klebsiella pneumoniae*. Identifikace *Klebsiella pneumoniae* dosáhla skóre 2,09, tedy identifikace na úrovni druhu. Závěr této studie uvádí, že MALDI-TOF MS je slibná metoda pro přímou identifikaci patogenů u pacientů s monomikrobiální bakteriální meningitidou. Nevýhodou této metody je to, že vyžaduje dostatečné množství vzorku cerebrospinálního moku s dostatečnou koncentrací bakterií. Dále tato metoda není vhodná v případech polymikrobiální infekce [41]. Tadros a Petrich ve své publikaci využili k přímé identifikaci bakterií z mozkomíšního moku komerční Sepsityper kit. Vzorky liquoru byly inokulovány do BACTEC hemokultivačních lahví. V tomto článku byl u polymikrobiálního vzorku (s koaguláza negativními stafylokoky) mozkomíšního moku detekován pouze jeden patogen (*Staphylococcus warneri*) s identifikačním skóre 1,7 [26].

Závěr

Metoda MALDI TOF MS je bezpochyby vhodná pro rychlou identifikaci bakteriálních původců infekcí, které se podařilo v čisté kultuře vykultivovat na pevná média (optimálně na krevní agar). Výsledky výše citovaných prací však ukazují, že tuto metodu bude možno využít v některých případech i pro přímou identifikaci bakterií v klinickém materiálu. Na základě poznatků z řady pracovišť se ukazuje, že největší potenciál této metody v rámci různých druhů klinického materiálu bude zřejmě u hemokultur.

Literatura

- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 2009;49(4):543–551.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 2015;6:791.
- Lohmann C, Sabou M, Moussaoui W, et al. Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS systems for yeast identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013;51(4):1231–1236.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, et al. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1169–1175.
- Veloo ACM, Knoester M, Degener JE, Kuijper EJ. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1501–1506.
- Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis: Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit. *Int J Microbiol*. 2015;2015:1–10.
- Adhikari NKJ, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet*. 2010;376(9749):1339–1346.
- 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.
- Vlek A, Bonten M, Boel C. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One*. 2012;7:e32589.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Intensive Care Medicine*. 2013;39(2):165–228.
- Raad I, Hanna H, Maki D. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(10):645–657.
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006;34(2):344–353.
- Peralta G, Rodríguez-Lera MJ, Garrido JC, Ansorena L, Roiz MP. Time to positivity in blood cultures of adults with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *BMC Infect Dis*. 2006;6:79.
- Afshari A, Schrenzel J, Ieven M, Harbarth S. Bench-to bedside review: Rapid molecular diagnostics for bloodstream infection—a new frontier? *Crit Care*. 2012;16(3):222.
- La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2009;4(11):8041.
- Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(11):1631–1638.
- Christner M, Rohde H, Wolters M, et al. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1584–1591.
- Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1542–1548.
- Martinez RM, Bauerle ER, Fang FC, Butler-Wu SM. Evaluation of three rapid diagnostic methods for direct identification of microorganisms in positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2521–2529.
- Schieffler KM, Tan KE, Stamper PD, et al. Multicenter evaluation of the Sepsityper™ extraction kit and MALDI-TOF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTEC™ FX and VersaTREK® diagnostic blood culture systems. *J Appl Microbiol*. 2014;116(4):934–941.
- Haigh JD, Green IM, Ball D, et al. Rapid identification of bacteria from bioMérieux BacT/ALERT blood culture bottles by MALDI-TOF MS. *Br J Biomed Sci*. 2013;70(4):149–155.
- Szabados F, Michels M, Kaese M, Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT™ (bioMérieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(2):192–195.
- Schmidt V, Jarosch A, März P, et al. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(3):311–317.
- Loonen AJ, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PF, van den Brule AJ. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(7):1575–1583.
- Meex C, Neuville F, Descy J, et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol*. 2012;61(11):1511–1516.
- Tadros M, Petrich A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and Sepsityper Kit™ for the direct identification of organisms from sterile body fluids in a Canadian pediatric hospital. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2013;24(4):191–194.
- Sogawa K, Watanabe M, Sato K, et al. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Anal Bioanal Chem*. 2011;400(7):1905–1911.
- Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SC, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2011;6(8):23285.
- Juiz P, Almela M, Melcion C, et al. A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:1353–1358.
- Prod'homme G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1481–1483.
- Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48(2):444–447.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(7):1007–1012.
- Schubert S, Weinert K, Wagner C, et al. Novel, Improved Sample Preparation for Rapid, Direct Identification from Positive Blood Cultures Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry. *J Mol Diagn*. 2011;13(6):701–706.

34. Saffert RT, Cunningham SA, Mandrekar J, Patel R. Comparison of three preparatory methods for detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(1):21–26.
35. Klein S, Zimmermann S, Köhler C, et al. Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. *J Med Microbiol.* 2012;61(3):323–331.
36. Lagacé-Wiens PR, Adam HJ, Karlowsky JA, et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol.* 2012;50(10):3324–3328.
37. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(9):2269–2281.
38. Idelevich EA, Grunewald CM, Wüllenweber J, Becker K. Rapid identification and susceptibility testing of *Candida* spp. from positive blood cultures by combination of direct MALDI-TOF mass spectrometry and direct inoculation of Vitek 2. *PLoS One.* 2014;9(12):114834.
39. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila M, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(6):2110–2115.
40. Köhling HL, Bittner A, Müller KD, et al. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol.* 2012; 61(3):339–344.
41. Segawa S, Sawai S, Murata S, et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin Chim Acta.* 2014;435:59–61.

Zpráva z kongresu SepsEast 2016

Ve dnech 9.–11. 11. 2016 proběhl v Budapešti již 3. ročník kongresu SepsEast (3rd Central and Eastern European Sepsis Forum). Cílem této akce je sblížení odborníků věnujících se sepsi ze střední a východní Evropy. Kongres měl přibližně 500 účastníků a odborná témata byla zaměřena především na intenzivní péči o kriticky nemocné septické pacienty, což zahrnovalo semináře o plicní dysfunkci, umělé plicní ventilaci, monitoraci, antimikrobiální terapii, využití biomarkerů, imunoterapii, metodách kontinuálního očišťování krve a perioperativní péči. Součástí programu byly rovněž přednášky věnované medicíně založené na důkazech, etice v intenzivní péči a dvě posterové sekce. Organizátorům kongresu se podařilo do programu zařadit některé přední světové odborníky na sepsi, nicméně největší prostor byl vyčleněn pro kolegy ze střední a východní Evropy.

K velmi zajímavým tématům probíraným na kongresu patřila otázka rychlosti kontroly zdroje infekce. Jak uvedl dr. Anand Kumar z Kanady, autor jedné z nejcitovanějších prací podporující podání antibiotik u septického šoku v průběhu prvních několika hodin od vzniku hypotenze, likvidace zdroje infekce musí být velmi rychlá. Podle dr. Kumara například perzistující abdominální sepsi, která není vyřešena do 6 hodin od svého vzniku (tj. od perforace střevní stěny), významně zhoršuje prognózu pro přežití (Odds Ratio 76,2). Součástí prezentace dr. Kumara bylo zdůraznění pravidla tzv. zlaté hodiny, tj. první hodiny od vzniku kritického stavu (např. šoku), během které existuje dobrá možnost kritickou situaci zvládnout.

Pro pokrok v léčbě sepse je důležitý seriózní způsob sběru dat a organizace péče. Tomuto tématu se věnoval dr. Frank Brunkhorst z německé Jeny. Dr. Brunkhorst se účastní rozsáhlého projektu, který zahrnuje sběr výsledků všech hemokultivačních vyšetření ve spolkové zemi Durynsko s počtem obyvatel kolem 2,5 milionů osob. Předběžné výsledky této velké studie ukázaly 16% pozitivitu hemokultivačních vyšetření, přičemž pouze 2% pozitivních výsledků byly vyhodnoceny jako kontaminace. Dr. Brunkhorst zdůraznil význam infektologického konzilia u lůžka pacienta s pozitivním hemokultivačním vyšetřením, které v případě sepse vyvolané *Staphylococcus aureus* významně zlepšuje přežití pacientů. Bakteriémie vyvolaná *S. aureus* (SAB, *S. aureus* bacteremia) je důležitým příkladem situace, kdy je nutné, aby péči řídil klinicky zaměřený odborník, který odpovídajícím způsobem plánuje diagnostiku a antibiotickou léčbu. Tento důvod vedl vedení univerzitní nemocnice v Jeně k vytvoření pozice pro infektologa-konzultanta, což je v podmínkách Německého spolkové republiky nový směr.

Dr. Brunkhorst rovněž zdůraznil, že oproti celkové tendenci zkracovat antibiotickou terapii je SAB příkladem relativně dlouhého podávání antibiotik. Při nekomplikované SAB se doporučuje 14denní antibiotická terapie, avšak při komplikovaném průběhu se antibiotika podávají nejméně 28 dnů.

Velká pozornost byla věnována imunologickým aspektům sepse, na které se soustředilo několik přednášejících. Dr. Axel Nierhaus z Německa zmínil využití stanovení exprese HLADR na monocytech a CD64 na granulocytech v krvi, poměru interleukinu 6 (IL-6) k IL-10 a imunoglobulinu M (IgM), IgA a IgG1, jejichž snížené hladiny predikující špatnou prognózu sepse. Problematice tzv. imunomonitoringu se rovněž věnovala dr. Malgorzata Mikaszewska-Sokolevitz z varšavské lékařské fakulty, která v přehledovém sdělení popsala všechny dobře známé imunitní parametry, které mohou pomoci v odhadu prognózy septických nemocných. Jednou z novinek, na kterou poukázala, je snížená schopnost T lymfocytů nemocných zotavujících se ze sepse odpovídat na antigeny. Význam lymfocytů u sepse a septického šoku podtrhl také dr. Roman Záhorec z bratislavské lékařské fakulty. Dr. Záhorec je autorem velmi citované práce z roku 2001, ve které popsal význam stanovení poměru neutrofilů a lymfocytů (NLCR, neutrophil to lymphocyte count ratio) u sepse. Tento poměr výborně odráží stav přirozené a získané imunity a je rovněž vynikajícím indikátorem intenzity zánětu. Hodnoty poměru nad 7 ukazují mírný zánět, hodnoty NLCR nad 11 zánět střední intenzity a hodnoty nad 23 svědčí pro kritickou zánětovou stimulaci. Nepříznivou prognózu pak naznačuje perzistence, nebo dokonce vzestup NLCR, pokud je pozorován i přes agresivní terapii kritického onemocnění. Je vhodné zdůraznit, že zavést NLCR do rutinní praxe je poměrně jednoduchá záležitost, jak jsme se nedávno přesvědčili i v naší nemocnici. Na kongresu opakovaně zazněl termín „Imunometr“, který je vlastně panelem různých imunitních parametrů sloužící odhadu stavu septického pacienta. Význam tohoto komplexního přístupu není jen v odhadu prognózy septického nemocného, ale může přinést celou řadu dalších informací zahrnujících možnost orientační predikce mikrobiální etiologie sepse, znalost, zda pacientova imunitní odpověď je přestřená nebo potlačená, či stanovení rizika sekundární (nozokomiální) infekce. Na druhou stranu dr. Zsolt Molnar (hlavní organizátor kongresu), ale i další odborníci opakovaně zdůraznili, že dobrý odhad prognózy nemocného v kritickém stavu nemůže vést ke změně přístupu ke konkrétnímu pacientovi a jeho léčba musí probíhat bez omezení i při špatných laboratorních parametrech.

Vzhledem k významu diagnostických biomarkerů sepse bylo několik prezentací zaměřeno na zkušenosti s jejich praktickým využitím. Největší pozornost byla věnována využití prokalcitoninu (PCT) u těžkých bakteriálních infekcí. V přednášce dr. Kristiána Táncoze (Szeged, Maďarsko) bylo poukázáno na význam sérových hladin PCT u bakteriální meningitidy, u které je prediktivní hodnota PCT spolehlivější než hodnota C-reaktivního proteinu (CRP) v séru, či dokonce v mozkomíšním moku (MM). Na druhou stranu u infekcí CNS po neurochirurgických operacích (tj. ventri-

kulitidy nebo shuntové meningitidy), které představují velkou diagnostickou výzvu pro infektologa-konzultanta, PCT v séru ani v MM není přínosné. Příčinou je velmi pravděpodobně kompartmentalizace zánětové odpovědi v CNS (sérová koncentrace PCT roste úměrně intenzitě systémové zánětové aktivity).

Využití PCT rovněž bylo diskutováno u intraabdominálních infekcí (dr. Fatima Paruk, Jižní Afrika). Dr. Paruk zdůraznila některé velmi důležité praktické informace týkající se vylučování PCT ledvinami. Zvýšené sérové hladiny PCT při renální insuficienci mohou přetrvávat i při správné antibiotické terapii a naopak mohou klesat při zvýšené glomerulární filtraci i přes selhání antibiotik. Ve vztahu k antibiotické terapii bylo zdůrazněno, že sérová koncentrace PCT je u intraabdominálních infekcí spolehlivější ukazatel než hladina CRP v séru. Zvláštní situaci pak představuje nitrobřišní kandidová infekce, při které dochází ke stimulaci produkce interferonu- γ tlumícího produkci PCT. Při používání PCT je důležité rovněž znát i neinfekční faktory stimulující jeho produkci, jako jsou například vaskulitidy, neinfekčních syndrom systémové zánětové odpovědi, malobuněčný plicní karcinom, karcinom štítné žlázy a aplikace thyreoglobulinu. Celkově z přednášek o biomarkerech sepse vyznělo, že stanovení PCT by mělo být zcela rutinní a že je velmi vhodné sledovat jeho kinetiku a nespolehat se jen na vstupní a případně kontrolní hodnotu.

SepsEast 2016 byl místem, kde se opakovaně diskutovala nová definice sepse a septického šoku (Sepsis-3). Mervyn Singer ze Spojeného království, jeden z autorů nové definice, uvedl řadu důvodů podporujících její využívání. Například výběr parametrů použitých v definici Sepsis-3 vycházel ze studia elektronických zdravotních záznamů obrovského množství pacientů, což definici činí velmi spolehlivou. Dr. Singer opakovaně zdůraznil využití skórovací-

ho systému SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) a jeho zkrácené varianty nazvané quick SOFA v každodenní praxi u lůžka. V diskuzi k přednášce dr. Singera zaznělo, že znalost SOFA by měla být součástí předatestační přípravy mladých lékařů v klinických oborech. Péče o septické pacienty se totiž netýká jen intenzivistů, kteří uvedené skórovací systémy denně používají. Opakovaně bylo zdůrazněno, že uvedené systémy skórování jsou velmi důležité na centrálním příjmu nebo na standardních odděleních nemocnic, neboť napomáhají včasnému zachytu sepse a septického šoku.

SepsEast je kvalitní odborná akce, která se opakuje každé 2 roky. Organizátoři připravili pěkný odborný a společenský program, který představoval možnost setkat se s kolegy z dalších středoevropských zemí, a to ve specifické atmosféře podzimní Budapešti. Kongres je také vhodnou vzdělávací aktivitou pro mladé kolegy, kterým do věku 29 let nabízí možnost účasti bez registračního poplatku. Nejlepší 4 postery z letošního kongresu budou publikovány v impaktovaném časopise *Journal of Critical Care*. Je potěšující, že hlavní cenu získala MUDr. Eva Bartáková za studii proteinů S100A8/9 a S100A12 u těžkých bakteriálních infekcí, což může být inspirací i pro další mladé lékaře z České republiky.

Podpořeno projektem AZV 15-30186A.

prof. MUDr. Michal Holub, Ph.D.
Klinika infekčních nemocí 1. LF UK a ÚVN
U Vojenské nemocnice 1200, 169 02 Praha 6
e-mail: michal.holub@uvn.cz

Stručné pokyny pro autory

Redakce přijímá příspěvky v češtině nebo ve slovenštině, které odpovídají odbornému profilu časopisu. Kromě dopisů redakci, diskuzí, zpráv a společenské rubriky jsou všechny přijaté práce recenzovány (*peer review*), přičemž se zachovává oboustranná anonymita. O výsledcích recenzního řízení a názoru redakce na konečnou úpravu článku je autor informován. Před definitivním odevzdáním do tisku bude autorovi zaslán provizorní výtisk práce k autorské korektuře, která musí být zaslána zpět do redakce do pěti pracovních dnů.

Některé články jsou uváděny v plném znění i na internetové stránce časopisu.

Příspěvky se zasílají do redakce časopisu jednak ve formě kompletního výtisku s obrazovou dokumentací a podpisy hlavního autora, jednak v elektronické podobě na CD nebo e-mailem na adresu redakce.

Titulní list obsahuje (a) údaje pro uvedení do časopisu: název, jména autorů ve zkrácené podobě a s odkazy na pracoviště, názvy pracovišť, typ sdělení a kontaktní adresu (včetně e-mailu) korespondujícího autora, (b) celá jména autorů, (c) údaje sloužící ke komunikaci autora s redakcí: telefon, fax, rodné číslo, bankovní spojení, (d) prohlášení, že zasláný text je určen pro otištění v časopisu *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* a nebyl ani nebude jinde publikován (vyločení duplicitních publikací), a klauzuli, že spoluautoři souhlasí s textem zasláného sdělení a s uveřejněním v tomto časopisu, (e) negativní prohlášení o sponzorování či střetu zájmů; v opačném případě, kdy je práce sponzorována (grantem, jinou organizací, výrobcem apod.) nebo dochází-li ke střetu zájmů (např. autor je přímo či nepřímo zainteresován na výsledcích výroby či prodeje, je majitelem popisovaného patentu apod.), musí být tato skutečnost v závěru sdělení uvedena, (f) u klinických studií čestné prohlášení o schválení místní etickou komisí a (g) u pokusů na zvířatech prohlášení, že byly dodrženy ústavní nebo národní předpisy a směrnice pro chov a experimentální užití zvířat. Formulář s podpisy autora a všech spoluautorů lze doplnit i během recenzního řízení.

Každý příspěvek musí být přiřazen k některému typu sdělení a podle toho je v redakci posuzován. Musí splňovat určité obsahové a formální požadavky: musí mít předepsaný rozsah, počet literárních odkazů a odpovídající souhrn v češtině (popř. slovenštině) a angličtině (viz tabulka). Původní práce se standardně rozdělují na oddíly Úvod – Materiál a metody – Výsledky – Diskuze – Závěr a má strukturovaný abstrakt rozdělený do odstavců Cíl práce, popř. východisko – (Materiál a) metody – Výsledky – Závěr, anglicky Background nebo Objective(s) – (Material and) Methods – Results – Conclusions. Přehledový článek má volnější formu, důraz je kladen na přehlednost a aktuálnost. Jednoduššími typy příspěvků jsou krátké sdělení, dopis redakci, zpráva, recenze knihy a oznámení. Doporučený postup se otiskuje ve znění, jak byl vydán garantující odbornou společností.

Grafy, schémata, tabulky, vzorce či obrázky musí být připojeny na zvláštním listu, na rubru s uvedením prvního autora a názvu práce. V textu je třeba na ně na příslušných místech uvádět odkazy. Digitální fotografie, tabulky, grafy a další ilustrace v elektronické podobě je vhodné zasílat v příloze textového souboru vždy jako samostatné dokumenty v původním formátu.

Formát bibliografických referencí je popsán a vysvětlen v podrobných pokynech, základní vzory citování literárních pramenů vyplývají z příkladů:

- Standardní článek v časopisu:
Dlouhý P, Herold I, Kolář M, et al. Postavení linezolidu v léčbě rezistentních gram pozitivních infekcí. *Klin Mikrobiol Inf Lek.* 2006;12(1):4–9.
- Článek v suplementu časopisu:
Křemen st J, Stříbrná J, Pavlíková A, et al. Metody molekulární biologie v dermatovenerologické diagnostice. *Prakt Léč.* 2005;85(Suppl 1):40–2.
- Monografie (kniha):
Wilson SJ. Blood cultures. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1992.
- Kapitola v knize:
Modr Z. Základy farmakokinetiky antibiotik. In: Vacek V, Hejzlar M (eds). Chemoterapie infekčních nemocí v klinické praxi. 1. vyd. Praha: Avicenum; 1988. s. 42–52.
- Článek ve sborníku:
Leib SL, Leppert D, Clements J, Lindberg RLP, Pfister LA, Täuber MG. Combined inhibition of tumor necrosis alpha converting enzyme and matrix metalloproteinases by BB1101 attenuates disease, mortality and brain damage in experimental bacterial meningitis (Paper 2044). Abstracts of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 1999 September 26–29; San Francisco, USA. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999.
- CD-ROM (1 CD ze sady):
Mildvan D. (editor). AIDS (Vol. I). In: Mandell GL (editor-in-chief). Atlas of Infectious Diseases on CD-ROM [CD-ROM]. London: Electronic Press Ltd.; 1996.
- Článek z internetu:
Scott LA, Stone MS. Viral exanthems. *Dermatol Online J.* 2003 Nov [cited 2004 Jan 10];9(3):4. Available from: <http://dermatology.cdlib.org/93/reviews/viral/scott.html>.

Převzaté rozsáhlejší partie textu a dokumentace musí být doloženy souhlasem autora a vydavatele původní publikace s otištěním. Sdělení nesmí porušit anonymitu pacienta.

Podrobné návody k členění textu a formální úpravě rukopisu, stejně jako některá pravopisná a názvoslovná doporučení, se nachází v úplných pokynech autorům na internetové stránce časopisu <http://kmil.trios.cz/>.

Tabulka: Přehled jednotlivých typů sdělení

Typ sdělení	Obvyklý rozsah	Počet literárních odkazů	Souhrn	Recenzní řízení
původní práce	8–16 normostran	10–20 referencí	strukturovaný	2 recenzenti
přehledový článek	10–20 normostran	20–50 referencí	nestrukturovaný	2 recenzenti
krátké sdělení	3–6 normostran	3–10 referencí	nestrukturovaný	1–2 recenzenti
dopis redakci	1–5 normostran	0–5 referencí	není	neprobíhá
zpráva	1–5 normostran	obvykle nejsou	není	neprobíhá