

KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE A INFEKČNÍ LÉKAŘSTVÍ

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

REDAKČNÍ RADA

Šéfredaktor

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

Zástupci šéfredaktora

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

Redakční rada

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

OBSAH

ÚVODNÍK

L. Rožnovský

71

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Nové technologie na testování citlivosti bakterií na antibiotika

P. Mlynářčík, M. Kolář, M. Röderová

72

Doporučení antimykotické profylaxe, diagnostiky a léčby v dětské hematologii – přehled literatury a doporučení odborníků s podporou PSDH

P. Sedláček, P. Múdry, J. Horáková, P. Keslová, L. Šrámková, V. Chrenková, P. Hubáček, J. Štěrba

85

PŮVODNÍ PRÁCE

Metody fenotypového důkazu New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) u *Klebsiella pneumoniae* izolovaných na Slovensku

E. Schrétrová, V. Takáčová, M. Nikš, L. Pastvová, L. Tomčo, L. Siegfried

79

Dysfunkce štítné žlázy při léčbě chronické hepatitidy B a C interferonem alfa – dvacetileté zkušenosti

I. Orságová, L. Rožnovský, L. Petroušová, M. Konečná, L. Kabieszová, K. Šafarčík, A. Kloudová

92

KRÁTKÉ SDĚLENÍ

Corynebacterium imitans izolované z hemokultury u pacienta se suspektní bakterémií – první izolace v humánním klinickém materiálu v České republice

P. Ježek, J. Zavadilová, R. Kolínská, P. Švec, J. Guttwirth, P. Petráš

98

KAZUISTIKA

Méně obvyklá diagnostika závažného průběhu leptospirózy

J. Sagan, L. Rožnovský, N. Petejová, J. Mrázek, D. Vaňková

102

ZPRÁVA

20. světový kongres – AIDS 2014 (IAC 2014), Melbourne, Austrálie

D. Sedláček

105

DOPIS REDAKCI

Dopis redakci

D. Chmelař

107

Vydání autorů k reakci RNDr. Dittmara Chmelaře, Ph.D., na článek Familiární výskyt botulismu – kazuistika, uvedeného v KMIL v červnu 2014

H. Ambrožová

107



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, Embase/Excerpta Medica Database a Scopus.

Všechny příspěvky kromě zpráv a dopisů redakci procházejí nezávislou recenzí.

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

Povoleno Ministerstvem kultury ČR pod č. MK ČR 7352.

ISSN 1211-264X

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



CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

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

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief

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

Editors

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

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

Prof. MUDr. Jiří Beneš, CSc.
Dept. Infect. Dis. 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



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 Nevečeřalová

Advertising: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

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

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

Lýskova 1594/33, 155 00 Praha 13-Stodůlky

CONTENTS

EDITORIAL

L. Rožnovský

71

REVIEWS

New technologies for antibiotic susceptibility testing of bacteria

P. Mlynářčík, M. Kolář, M. Röderová

72

Guidelines for antifungal prophylaxis, diagnosis and therapy in pediatric hematology and oncology – a review of literature and expert recommendations

*P. Sedláček, P. Múdry, J. Horáková, P. Keslová, L. Šrámková,
V. Chrenková, P. Hubáček, J. Štěřba*

85

ORIGINAL ARTICLE

Methods of phenotypic determination of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Slovakia

*E. Schréterová, V. Takáčová, M. Nikš, L. Pastvová,
L. Tomčo, L. Siegfried*

79

Thyroid dysfunction during interferon alpha therapy for chronic hepatitis B and C – twenty years of experience

*I. Orságová, L. Rožnovský, L. Petroušová, M. Konečná,
L. Kabieszová, K. Šafarčík, A. Kloudová*

92

SHORT COMMUNICATION

Corynebacterium imitans isolated from blood culture in a patient with suspected bacteremia – the first isolation from human clinical material in the Czech Republic

P. Ježek, J. Zavadilová, R. Kolínská, P. Švec, J. Guttwirth, P. Petráš

98

CASE REPORT

Unusual diagnosis of severe leptospirosis

J. Sagan, L. Rožnovský, N. Petejová, J. Mrázek, D. Vaňková

102

NEWS

20th International AIDS Conference (IAC) 2014 (AIDS 2014), Melbourne, Australia

D. Sedláček

105

LETTER TO THE EDITOR

Letter to the editor

D. Chmelař

107

The author's reply

H. Ambrožová

107

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

A peer – reviewed journal

4 issues per volume.

ISSN 1211-264X

Copyright © Trios Ltd. All rights reserved.

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

Úvodník

Vážené kolegyně, vážení kolegové, milí čtenáři časopisu KMIL,

za delších podzimních večerů se můžete začíst do třetího letošního čísla našeho společného mezioborového časopisu. Pestrá paleta článků vypovídá o trvajícím zájmu českých a slovenských mikrobiologů, infektologů a dalších odborníků publikovat své práce v recenzovaném časopise KMIL, který je indexován v několika významných mezinárodních databázích.

Závažným problémem současnosti je šíření multirezistentních kmenů bakterií, včetně bakterií rezistentních na karbapenemy. V původní práci kolegyně Schréterová se spolupracovníky z Košic popsala přítomnost New Delhi metallo-beta-laktamázy u *Klebsiella pneumoniae* u prvních 5 pacientů na Slovensku, současně poukázala na to, že izolace pacientů a zvýšený hygienicko-epidemický režim jsou nejdůležitějšími opatřeními pro prevenci dalšího šíření multirezistentních kmenů.

Přehledný článek olomouckých autorů pod vedením kolegyně Mlynářčička navazuje na uvedenou problematiku, přináší přehled současně užívaných, ale i nových metod pro rychlé určování bakterií a rychlé testování jejich citlivosti na antibiotika. Přitom citlivost bakterií na antibiotika je mnohdy známa dříve než přesné určení bakterie vyvolávající onemocnění, což může zkrátit období empirické léčby a zlepšit prognózu pacienta.

V druhém přehledném sdělení rozsáhlý kolektiv dětských onkologů pod vedením prof. Sedláčka z Motola poukazuje na význam mykotických infekcí v dětské hemato-onkologii, včetně jejich diagnostiky, profylaxe a léčby. Mykotické infekce u imunosuprimovaných osob představují specializovanou problematiku, kterou většinou v současné době zvláda-

jí nejlépe lékaři příslušných oborů včetně hemato-onkologů. Přesto je žádoucí, aby i infektologové měli dostatečné znalosti o diagnostice a léčbě mykotických infekcí, a to nejen u HIV pozitivních pacientů, ale i dalších imunosuprimovaných osob, k čemuž může přispět i zmíněné pěkně napsané přehledné sdělení.

V druhé původní práci se kolegyně Orságová z Ostravy ve větším souboru pacientů zaměřila na sledování četnosti poruch štítné žlázy u pacientů s chronickou hepatitidou B a C, kteří byli léčeni interferonem alfa.

V první kazuistice kolega Ježek z Příbrami se spolupracovníky informuje o první izolaci vzácné bakterie *Corynebacterium imitans* z hemokultury pacienta v naší republice, článek je doplněn o literární přehled s dalšími informacemi o uvedené bakterii s dosud neobjasněným patogenním potenciálem. V následující kazuistice kolega Sagan z Ostravy upozorňuje na možnost časně přímé diagnostiky leptospirózy s průkazem původce v moči pomocí polymerázové řetězové reakce.

V posledním sdělení doc. Sedláček informuje o aktuálních trendech a problémech v oblasti HIV infekcí, které byly diskutovány v letošním roce na kongresu o AIDS v australském Melbourne.

Přeji Vám poklidný zbytek roku bez závažných importovaných nákaz.

Luděk Rožnovský
člen redakční rady

Upozornění redakce

Vážení čtenáři,

v letošním roce již není předplatné časopisu **Klinická mikrobiologie a infekční lékařství** hrazeno z členských příspěvků společností SIL a SLM. Proto je třeba si předplatné časopisu hradit samostatně.

Je stále velké množství lékařů, kteří předplatné neuhradili, a časopis je jim zasílán. Žádáme o úhradu předplatného, v opačném případě bude ukončeno zasílání časopisu. Do zprávy pro příjemce prosím **uveďte KMIL a vaše celé jméno a telefon (event. za koho je předplatné hrazeno)**. Tyto údaje jsou nutné pro identifikaci **platby!**

Předplatné pro rok 2014:

- | | |
|---|------------|
| • členové odborných společností v rámci ČLS JEP (SIL, SLM, SKM) | 420,00 CZK |
| • ostatní předplatitelé v České republice | 520,00 CZK |
| • odběratelé na Slovensku | 23,00 EUR |
| • odběratelé mimo ČR | 30,00 EUR |

Platby provádějte bankovním převodem na CZK účet č.: 577266153 / 0300 (ČSOB, a. s., Praha).

Nebo pro zahraniční odběratele na EURo účet č.: 4007715058 / 7500 (ČSOB, a. s., Bratislava).

Děkujeme

Redakce KMIL

Nové technológie na testovanie citlivosti baktérií na antibiotiká

P. MLYNÁRČIK, M. KOLÁŘ, M. RÖDEROVÁ

Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

SÚHRN

Mlynářčík P., Kolář M., Röderová M.: **Nové technológie na testovanie citlivosti baktérií na antibiotiká**

Za posledné dve desaťročia pozorujeme rýchly nárast infekcií spôsobených mikroorganizmami s mnohonásobnou rezistenciou. Naše možnosti antibiotickej terapie sú vystavené obrovskému nebezpečenstvu v dôsledku šírenia rezistentných patogénov. Mnoho štúdií dokazuje, že včasné poskytnutie primeranej antibiotickej liečby je nesmierne dôležité pri záchrane života. Momentálne sa lekári spoliehajú na klinické, epidemiologické a demografické údaje, ktoré im napomáhajú pri výbere empirickej terapie, nakoľko výsledky kultivácie a testovania citlivosti na antibiotiká môžu trvať až 48 hod. a dlhšie. A preto je nevyhnutný záujem o skorú a citlivejšiu detekciu rezistentných baktérií. V tomto prehľade poskytujeme zhrnutie najpokročilejších metód (techniky založené na PCR, prietoková cytometria, hmotnostná spektrometria, mikročipy a iné) určených na rýchlu detekciu antibiotickej rezistencie u baktérií, ktoré by sa mohli stať vo veľmi blízkej budúcnosti cennými alternatívami k už existujúcim metódam (fenotypové metódy).

Kľúčové slová: testovanie citlivosti, antibiotiká, rezistencia, technológie

SUMMARY

Mlynářčík P., Kolář M., Röderová M.: **New technologies for antibiotic susceptibility testing of bacteria**

The past two decades have witnessed increasing infections due to multidrug-resistant bacteria. Therefore, transmission of these pathogens could limit the antibiotic therapy options. Many reports suggest that initiation of appropriate antimicrobial therapy can be lifesaving. Physicians rely on combination of clinical, epidemiological and demographic data to guide empirical therapy because results of culture and antimicrobial susceptibility testing may require 48 hours or longer. Therefore, an ongoing effort for the development of earlier and more sensitive detection of resistant bacteria is inevitable. This review presents a summary of the most advanced methods (e.g. PCR-based techniques, flow cytometry, mass spectrometry, microarrays and others) that are able to rapidly detect antibiotic resistance in bacterial pathogens which have the potential to become valuable alternatives to the existing methods (standard phenotypic resistance testing) in the very near future.

Keywords: susceptibility testing, antibiotics, resistance, technology

Klin mikrobiol inf lék 2014; 20(3):72–78

Adresa: Mgr. Patrik Mlynářčík, Ph.D., Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, e-mail: patrik.mlynarcik@upol.cz

Došlo do redakcie: 21. 5. 2014

Přijato k tisku: 11. 6. 2014

Úvod

Výber vhodnej antibiotickej liečby pre rôzne typy bakteriálnej infekcie si vyžaduje identifikáciu etiologického agens, vrátane určenia antibiogramu – t. j. stanovenie citlivosti baktérie k antibiotikám. V rutinej klinickej praxi tento proces zaberie najmenej 24 hod., pričom empirická terapia je zahájená na základe predpokladaného pôvodcu ochorenia a podľa miestnych epidemiologických poznatkov. Metódy testovania citlivosti na antibiotiká (TCA) u bakteriálnych izolátov sa snažia znížiť trvanie empirickej terapie a uľahčiť skoré zahájenie cielenej antibiotickej liečby proti pôvodcovi infekcie. Mnohé štúdie potvrdili, že rýchla dostupnosť výsledkov testov citlivosti na antibiotiká môže zlepšiť pacientove vyhliadky a môže prispieť k zníženiu výdavkov pri starostlivosti o zdravie, pričom oneskorené zahájenie adekvátnej antibiotickej liečby je spojené s vyššou

úmrtnosťou pacientov pri určitých bakteriálnych infekciách [1,2]. V tomto duchu rýchle zahájenie primeranej liečby voči infekcii spôsobenej baktériami môže hrať kľúčovú úlohu i vo výskyte a šírení rezistentných kmeňov. V tomto prehľade venujeme hlavnú pozornosť technikám, ktoré boli vyvinuté na rýchle odhalenie antibiotickej rezistencie u baktérií a uvádzame príklady ich využitia.

Aktuálne používané metódy

Najpoužívanejšie metódy skúmajúce rezistenciu baktérií na antibiotiká v klinických vzorkách zisťujú fenotypovú rezistenciu meraním bakteriálneho rastu za prítomnosti testovaného antibiotika (fenotypové metódy). Patrí sem difúzna disková metóda, agarová dilačná metóda, mikrodilačná metóda, antimikrobiálne gradientové metódy (napr. Etest),

a rôzne komerčne dostupné automatizované systémy (napr. Phoenix Automated Microbiology systém od BD Diagnostics a Vitek systémy od bioMérieux). Okrem vysokej citlivosti na detekciu antibiotickej rezistencie hlavnou výhodou týchto techník je ich jednoduché prevedenie a dostupnosť. V prípade používania dilučných, mikrodilučných a antimikrobiálnych gradientových metód je možné stanoviť hodnotu MIC (minimálnej inhibičnej koncentrácie), ktorá ukazuje na mieru citlivosti baktérie k danému antibiotiku a umožňuje cielenejšie nasadenie antibiotickej liečby. Nevýhodou týchto metód je, že všeobecne vyžadujú čisté kultúry na vykonanie testov citlivosti a sú časovo náročné [3].

Medzi nefenotypové TCA metódy, založené na analýze nukleových kyselín, patria PCR testy (identifikácia rezistentných génov), multiplex PCR a digitálna PCR. Hlavnou výhodou týchto PCR metód je to, že môžu byť vykonané v krátkom časovom úseku, v niektorých prípadoch použitím klinických vzoriek bez ich predchádzajúcej úpravy. PCR má preto očividne potenciál značne znížiť detekčnú dobu a rýchlo poskytnúť informáciu o antibiotickej rezistencii. Nevýhodou tohto prístupu je to, že väčšinou nedeteguje všetky markery rezistencie, je drahý, nie je všade zavedený, neposkytuje MIC hodnoty, a prítomnosť rezistentných génov nemusí byť stále vo vzájomnom vzťahu s fenotypovou rezistenciou, ako je tomu napríklad u karbapenemáz u gramnegatívnych baktérií. Ďalším prístupom je kvantitatívna real-time PCR. Tento prístup monitoruje počet kópií bakteriálneho genómu prítomných počas rastu izolovanej baktérie za prítomnosti testovaného antibiotika, čo umožňuje rozlíšenie citlivých kmeňov od rezistentných. Výhodou metódy je rýchla detekcia rezistentného kmeňa v prítomnosti antibiotík a na rozdiel od PCR prístupov nepriamo meria fenotypovú rezistenciu zistením rastu za prítomnosti antibiotika, čiže nezávisí pri nej od mechanizmu rezistencie. Jej hlavnou nevýhodou je, že si vyžaduje predošlú kultiváciu a nemôže byť použitá priamo na klinické vzorky [3].

Alternatívy blízkej budúcnosti na rutinné TCA

MALDI. Matricou asistovaná laserová desorbcia/ionizácia s detekciou času letu (MALDI-TOF) predstavuje prostriedok na rýchlu identifikáciu organizmov s medicínskym významom a môže byť tiež použitá ako TCA metóda. Použitie MALDI-TOF na detekciu rezistencie najčastejšie rozlišuje spektrá rezistentných a citlivých izolátov použitím celých buniek alebo pôvodných extraktov. Pomocou MALDI boli identifikované meticilín-rezistentné *Staphylococcus aureus* (MRSA) [4], AmpC β -laktamáza u *Escherichia coli* ATCC 700926 [5] a prítomnosť vanB génu (zodpovedný za rezistenciu na vankomycín) u izolátov *Enterococcus faecium* [6]. Ďalšia publikácia ukázala rozdiely v spektre u karbapenemázy produkujúcich a neprodukujúcich *Bacteroides fragilis* [7].

MALDI-TOF bola tiež použitá na detekciu hydrolýzy antibiotík počas ich inkubácie s bakteriálnym izolátom za účelom detekcie degradačných produktov. Príkladom toho je detekcia karbapenemázy aktivity (IMP-1, IMP-2, VIM-1, VIM-2, KPC-2, KPC-3, NDM-1, OXA-48 a OXA-162) u rôznych gramnegatívnych organizmov (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*

baumannii a *Citrobacter freundii*). Hydrolýza antibiotika sa v hmotnostnom spektre prejavila prítomnosťou rôznych pík (neaktívna hydrolyzovaná forma antibiotika) oproti pôvodným píkom pozorovaným vo východiskovom hmotnostnom spektre [3,8–10].

V ďalšej štúdií bola MALDI technika použitá na analýzu jednonukleotidového polymorfizmu (z anglického Single Nucleotide Polymorfism) za účelom epidemiologickej typizácie 147 kmeňov MRSA na 16 rôznych miestach. Genotypizácia bola vykonaná pomocou techniky „Sequenom MassARRAY iPLEX platform“, ktorá kombinuje multiplexovú jednu bázu predlžujúcu PCR (z anglického Multiplexed Single-Base Extension PCR) s hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF, pričom amplikóny slúžia na detekciu jednonukleotidového polymorfizmu. *MecA* PCR amplikón bol úspešne identifikovaný pomocou MALDI-TOF MS u všetkých 147 kmeňov [11].

V ďalšej práci bola popísaná minisekvenovacia metóda založená na MALDI-TOF, ktorá bola vyvinutá na rýchlu identifikáciu jednonukleotidových polymorfizmov na kodónoch 104, 164 a 238 génu *bla_{TEM}*. Metóda bola potvrdená testovaním kmeňov *E. coli* a *K. pneumoniae* nesúcich známe *bla_{TEM}* génové sekvencie [12].

Kombinácia predlžovania primeru (z anglického Primer Extension, PEX) s MALDI-TOF viedla k detekcii ganciklovir rezistentnej mutácie v cytomegalovírusoch. Táto metóda odhalila mutácie vedúce k rezistencii skôr a bez straty špecifickosti v porovnaní s použitím real-time PCR a Sanger sekvenovania. Podobné analýzy amplikónov generovaných pomocou PCR sú základom pre detekciu rezistencie použitím pokročilejšej elektrosprejovej ionizačnej hmotnostnej spektrometrie (z anglického Electrospray Ionization Mass Spectrometry, PCR/ESI-MS) [8]. Táto pokročilejšia metóda bola použitá pri identifikácii izolátov *Acinetobacter* sp. rezistentných na chinolón pomocou mutácií v regiónoch referenčných génov *gyrA* a *parC*, ktoré určujú rezistenciu na chinolón. Metóda PCR/ESI-MS identifikovala správny fenotyp v takmer 99% izolátoch. Hoci je možné, že zvýšená aktivita efluxných púmp (z anglického Efflux Pumps), ako sú AdeABC alebo AbeM, môžu tiež prispievať v týchto izolátoch k rezistencii na chinolón. Existujú dve dôležité obmedzenia PCR/ESI-MS. Po prvé, zostáva nejasné, či detekcia rezistentného génu stále naznačuje, že bude prítomná fenotypová rezistencia. Po druhé, vysvetlenie výskytu mutácií v rezistentných génoch, ktoré existujú vo viacnásobných kópiách, je potenciálne problematické. Úroveň klinickej presnosti a predvídateľnosti zostávajú dôležitou výzvou, pretože dávka génov, úroveň transkripcie a expresie zatiaľ nie sú merateľné týmito metódami. Toto ďalšie zlepšenie si bude vyžadovať vykonanie ďalších štúdií. Avšak určenie rezistencie na chinolón rýchlou molekulovou metódou (v tomto prípade menej ako 6 hod.) môže mať dôležitý vplyv na klinický výsledok poskytnutím pomoci pri výbere antibiotík určených na liečbu infekcií [13].

Ďalej je tu množstvo príkladov, keď bola hmotnostná spektrometria MALDI-TOF použitá na sledovanie účinkov antimikrobiálnych látok na proteínový profil antibiotikom citlivých mikroorganizmov. Rozdiely v profiloch u *Candida albicans* narastali v závislosti na zvyšujúcej sa koncentrácii flukonazolu, čo viedlo k formulovaniu minimálneho profilu

zmeny koncentrácie (z anglického Minimal Profile Change Concentration, MPCC), ktorý bol definovaný ako najnižšia koncentrácia lieku, pri ktorej môže byť preukázaná zmena v profile. Autori našli veľmi veľkú zhodu medzi MPCC a hodnotami minimálnej inhibičnej koncentrácie. Podobne bola hmotnostná spektrometria MALDI-TOF použitá na určenie rezistencie na kaspofungín sekundárne na základe *fkS* mutácií u *Candida* sp. a *Aspergillus* sp. Kmene boli vystavené zvyšujúcim sa koncentráciám kaspofungínu použitím mikrodilučného formátu a následne boli analyzované na MALDI-TOF. Pre každú koncentráciu lieku bol vypočítaný MPCC pre všetky kmene. Toto usporiadanie zistilo 100% zhodu pre všetky izoláty použitím CLSI (Inštitút pre klinické a laboratorné štandardy) odporúčaných hraničných hodnôt MIC alebo minimálnej efektívnej koncentrácie (z anglického Minimal Effective Concentration). Len dva *Candida* sp. boli nesprávne interpretované ako necitlivé, čo predstavuje zhodu 94,1 % [8].

MALDI-TOF technika bola tiež použitá na detekciu porínov u *Klebsiella* sp., nakoľko strata porínov zohráva dôležitú úlohu pri rezistencii baktérií na karbapenémy. Táto štúdia ďalej rozšírila využitie MALDI-TOF v laboratóriách klinickej mikrobiológie zameraných na štúdiu mechanizmov rezistencie [14].

Hlavnými výhodami používania hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF na identifikáciu rezistentných kmeňov na základe rozdielov v spektrách sú extrémna rýchlosť a vysoká automatizácia. Ďalej je to detekcia enzýmovej aktivity bez zväženia príslušných typov enzýmov. Tak, ako je to aj v prípade PCR techník, výsledky získané touto metódou nemusia stále priamo súvisieť s fenotypovou rezistenciou a rozdiely medzi kmeňmi, ktoré nesúvisia s rezistenciou, môžu komplikovať interpretáciu výsledkov [3].

Prietoková cytometria (PC) je založená na rozlíšení živých a mŕtvych buniek prostredníctvom farbiva po vystavení účinku antibiotík. Pripúšťa morfológické zmeny, fyziologickú a metabolickú aktivitu buniek. Prostredníctvom procesu farbenia s farbivami nukleových kyselín (napr. propidium jodid), ktoré neprenikajú cez bunkové membrány zdravých organizmov, môže byť podiel buniek v umierajúcom alebo mŕtvom stave rýchlo stanovený pomocou skúmania emisného spektra hneď po tom, čo bunky prejdú individuálne cez prietokový kanál a keď je farbivo excitované laserom. PC ako metóda TCA bola tiež popísaná pre *C. albicans*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* a *Yersinia* sp. TCA pomocou PC bolo najmenej o 20 % rýchlejšie ako u klasických metód určených pre *E. coli*, *P. aeruginosa* a *S. aureus*, pričom širokospektrálne β -laktamázy môžu byť spoľahlivo detegované pomocou PC do 1–2 hod. Samotná technológia sa zatiaľ neukázala ako najdôležitejší hráč na trhu s TCA, hoci už boli spustené komerčné testovania. Niektoré z vnímaných prekážok samotnej metodológie sa týkajú schopnosti rozlišovať bunkové poškodenie spôsobené antibiotikami, autofluorescencie určitých bakteriálnych druhov a obrovského množstva práce potrebnej na overovanie/potvrdenie klinickej databázy a samotnej metódy [8].

Mikročipy (z anglického Microarrays). Mikročipové technológie identifikujú špecifické sekvencie nukleových kyselín použitím komplementárnych oligonukleotidov. Tieto oligonukleotidy-sondy potom v pozitívnom prípade hybridizujú so značenou DNA z analyzovanej vzorky. Početné štúdie použili mikročipy na detekciu β -laktamázových génov u gramnegatívnych baktérií, z ktorých niektoré môžu poskytnúť výsledky v priebehu jedného dňa. V jednej štúdii bola real-time PCR kombinovaná s mikročipom za účelom identifikácie respiračných patogénov spôsobujúcich zápal pľúc a detegujúca prítomnosť 24 génov spojených s rezistenciou na β -laktamové antibiotiká priamo z klinických vzoriek. Táto technika ukázala vysokú citlivosť a špecifickosť na detekciu rezistentných génov s detekčným limitom 10–100 DNA kópií [3].

Mikročipová technológia poskytuje schopnosť detegovať široké množstvo rozdielnych génov rezistencie v jednej skúške v porovnaní s prístupom založeným na PCR, ktorý môže detegovať len hŕstku génov. Z toho dôvodu sú mikročipy v zásade vhodné pre baktérie, v ktorých je množstvo rozdielnych mechanizmov rezistencie alebo variánt jedného mechanizmu, ako napríklad prípad β -laktamáz u gramnegatívnych baktérií. Dáta získané z mikročipov použitím vyššie uvedeného prístupu sa nemusia stále zhodovať s fenotypovou rezistenciou a tento prístup neposkytuje MIC hodnoty. Navyše táto metóda môže mať obmedzenú schopnosť detegovať rezistenciu v izolátoch poskytujúcich nové a necharakterizované mechanizmy rezistencie [3].

Mikrofluidika (z anglického Microfluidics). Bolo ukázané, že prístroj pozostávajúci z mikrofluidných agarózových kanálov môže sledovať rast jednotlivých buniek použitím mikroskopie za prítomnosti antibiotík. Použitím tohto prístupu môžu byť získané približné MIC hodnoty v priebehu 3–4 hod. [15]. V inej štúdii bola použitá elektrochemická kvantifikácia hladín 16S rRNA na meranie bakteriálneho rastu za prítomnosti antibiotika. Táto metóda bola potvrdená priamo na vzorkách moču pacientov a bola schopná poskytnúť výsledky citlivosti baktérií na antibiotiká do 3,5 hod. s 94% zhodou so štandardnými TCA metódami. Bol vyvinutý aj mikrofluidný pH senzor, ktorý môže byť použitý na detekciu pH zmien, ktoré sa vyskytujú počas bakteriálneho rastu za prítomnosti antibiotík, kvôli akumulácii metabolických produktov. S týmto prístupom môžu byť generované krivky bakteriálneho rastu za krátky čas (2 hod.) použitím nanolitrových objemov kultúr. Táto nová metóda poskytuje spoľahlivú metódu na rýchle určenie MIC hodnôt jednotlivých antibiotík [3].

Okrem veľmi malých objemov analytu, ktoré sú potrebné na vykonanie tejto skúšky, tento prístup má výhodu aj v tom, že môže byť veľmi automatizovaný a s potenciálom poskytnúť výsledky extrémne rýchlo. Čipy použité v týchto skúškach môžu byť vložené do prenosných prístrojov a vďaka ich malej veľkosti môžu uľahčiť testovanie citlivosti na antibiotiká v mieste liečby. V mnohých prípadoch mikrofluidné prístroje nepriamo merajú bakteriálny rast za prítomnosti antibiotika, a preto budú dosiahnuté výsledky dobre korešpondovať s fenotypovou rezistenciou. Toto hľadisko robí túto metódu tiež vhodnou na použitie pri detekcii rezistencie u baktérií, pre ktoré nie sú mechanizmy rezistencie dobre známe [3].

Prístupy založené na lýze buniek po inkubácii s antibiotikom (z anglického Cell Lysis-Based Approaches). Bakteriálna kultúra je najprv inkubovaná so želanými koncentraciami antibiotika a potom imobilizovaná v agarózovom

mikrogéli. Imobilizované baktérie sú potom ponorené do lyzačného roztoku, čo má za následok rozklad nukleoidu v baktériách, ktoré boli ovplyvnené počas inkubácie s antibiotikom. Následne sú baktérie inkubované s DNA-špecifickým fluorescenčným farbivom a neporušenosť nukleoidu je zviditeľnená mikroskopiou (fragmentácia nukleoidu je viditeľná u citlivého kmeňa, zatiaľ čo rezistentný kmeň si udržuje neporušený nukleoid). Tento prístup bol potvrdený na detekciu chinolónovej a ampicilínovej rezistencie u *E. coli* a taktiež na detekciu rezistencie na karbapenémy u *A. baumannii*. Postup môže byť vykonaný za 100 min. a ukázal dobrú koreláciu s mikrodilučnými a Etest dátami. Tento prístup by mohol poskytnúť približné MIC hodnoty, pretože fragmentácia nukleoidu je zviditeľnená po inkubácii s rôznymi koncentraciami testovaných antibiotík. Doposiaľ popísané štúdie overili techniku len použitím purifikovaných bakteriálnych kultúr a ostáva ešte overiť, či môže byť táto technika použitá priamo na klinické vzorky. Výhodou tejto metódy je, že výsledky sú získané bez ohľadu na mechanizmus, ktorý produkuje rezistenciu [3].

RNA znaky (z anglického RNA Signatures). Na rozdiel od DNA, RNA transkriptóm navyše poskytuje aj veľmi dôležité dynamické fenotypové informácie. V skratke, expozícia antibiotikám môže spustiť transkripčné reakcie u citlivých, ale nie u rezistentných mikróbov v priebehu niekoľkých minút [16,17]. Jedná sa vlastne o identifikáciu **SOS proteínov** (šokové proteíny), keďže vývoj antibiotickej rezistencie bol prepojený aj s bakteriálnou SOS odpoveďou na stres. Transkripčné reakcie u citlivých baktérií môžu mať za následok vznik rezistencie na antibiotikum. Počas normálneho rastu baktérie (bez prítomnosti antibiotika) sú tieto SOS gény potlačené. SOS odpoveď bola doposiaľ popísaná u mnohých bakteriálnych druhov, avšak nie je známy presný počet indukovaných proteínov tvoriacich súčasť celkovej SOS odpovede u jednotlivých patogénov. Väčšina SOS génov kóduje proteíny, ktoré sú zapojené do ochrany, opravy, replikácie, mutagenézy a metabolizmu DNA. Bolo popísané, že niektoré antibiotiká používané v klinickej praxi, ako napríklad chinolóny a streptomycín, sú dobrými induktormi SOS odpovede a následne zvyšujú mutačnú frekvenciu [18]. Chinolóny, DNA poškodzujúce antibiotiká, môžu tiež stimulovať vznik rezistencie na liek prostredníctvom rekombinácie nezávislej na SOS odpovedi a skrz indukcie procesov sprostredkovaných pomocou RecA, vrátane homologickej rekombinácie a SOS-riadenou polymerázou náchylnou k chybám [19-21]. β -laktamázy môžu tiež indukovať SOS odpoveď pomocou RecA a DpiAB dvojzložkového systému, pričom tieto lieky ukázali aj schopnosť indukcie DinB spôsobom nezávislým od SOS, čo malo za následok zvýšené posunové mutácie [22-24]. Štúdium týchto SOS génov (SOS regulón) pomôže lepšie pochopiť vývoj bakteriálnej rezistencie voči antibiotikám. Navyše, zablokovanie indukcie SOS génov by mohlo byť prostriedkom zabraňujúcim vývoju bakteriálnej rezistencie a slúžiacim na kontrolu významných patogénov.

Ďalej bolo ukázané, že detekcia súboru RNA transkriptov u patogénov môže poskytnúť postačujúcu špecifickosť na presné diagnostikovanie prítomnosti širokej škály patogénov a rozlíšiť organizmy citlivé a rezistentné na antibiotikum. Použili sa pritom komerčne dostupné metódy na sta-

novenie množstva RNA (nCounter analysis, NanoString Technologies), ktoré vyžadujú minimálne ošetrovanie vzoriek a žiadne enzymatické spracovanie. RNA v neupravenom kultivačnom lyzáte alebo vo vzorkách pacientov bola hybridovaná so súborom fluorescenčne značených oligonukleotidových sond navrhnutých tak, aby označili špecifické transkripty v rámci širokej škály sledovaných organizmov. Sondy navrhnuté pre daný organizmus označia transkripty, ktoré identifikujú organizmus špecificky na úrovni druhu a zároveň umožňujú merať ich transkripčnú reakciu po vystavení antibiotiku. Prirodzená hojnosť RNA transkriptov spolu s vylepšenými RNA detekčnými metódami nám umožňuje určiť tieto expresné črty priamo zo vzoriek pacientov bez potreby ďalšej izolácie organizmu alebo purifikácie nukleových kyselín a amplifikácie [16].

Váženie mikrobiálnych buniek pomocou vibrujúcich konzol (z anglického Microbial Cell Weighing by Vibrating Cantilevers). Konzoly obsahujúce malé kanály umožňujúce mikrobiálny prechod môžu byť vytvorené tak, aby vibrovali nepretržite. Keď baktéria cez ne prejde, ich váha (v rozsahu femtogramov) môže zapríčiniť zmenu vo frekvencii pohybu konzoly. Číže menej husté bunky zapríčia inú zmenu, ako hustejšie bunky. Keď sú bunky vystavené antimikrobiálnym látkam, ich rastúca hustota sa mení a to je merateľné. Tento princíp bol osvedčený použitím ampicilín-rezistentných a citlivých izolátov *Citrobacter rodentium*. Bolo tiež ukázané, že resuscitácia oboch fenotypov po osmotickom šoku za prítomnosti alebo neprítomnosti ampicilínu umožňuje rýchlu diferenciáciu v krátkom časovom rozpätí [8].

Ďalej bol vyvinutý rýchly biosenzor na detekciu bakteriálneho rastu použitím vibrujúcich konzol, ktoré obsahujú určitý počet fixovaných, ale stále živých buniek. Zmena vo frekvencii rezonancie ako funkcia narastajúcej hmotnosti na konzole vytvára základ pre detekčnú schému. Vypočítaná hmotnosť senzitivita podľa mechanických vlastností senzora konzoly je približne 50 pg/Hz, čo predstavuje hmotnosť asi 100 buniek *E. coli*. Senzor bol schopný detegovať aktívny rast buniek *E. coli* počas 1 hodiny. Okrem toho môže byť nepotlačený rast rezistentných buniek stanovený počas 2 hod. po pridaní antibiotík. Technológia konzol bola tiež použitá na stanovenie väzby vankomycínu s prekurzormi bunkovej steny a na meranie účinkov kolistínu na *P. aeruginosa* [8].

Použitie visutých nanokanálových rezonátorov (z anglického Suspended Nanochannel Resonators, SNR) na meranie bakteriálnej hmotnosti v roztoku bolo ešte presnejšie. SNR sa skladal z konzoly so zabudovaným nanokanádom. Okrem toho bola zavedená nová metóda, ktorá používa odstredivú silu spôsobenú vibráciami konzoly, ktorá slúži na zachytenie častôčiek na voľnom konci SNR. Konzolové systémy a presné meracie techniky nepochybne poskytujú zaujímavú možnosť pre vývoj multiplexových TCA metód [8].

Obmedzením konzolovej metódy je to, že neposkytuje žiadne informácie o metabolickom stave mikroorganizmu infikujúceho pacienta. Preto nie je možné určiť, či antibiotiká potláčajú bakteriálny rast a životaschopnosť. Súčasná štúdia popísali určenie antibiotickej rezistencie u baktérií prostredníctvom monitorovania metabolickej aktivity baktérie.

Metódy monitorujúce metabolickú aktivitu patogénov. Najzaujímavejšou nanotechnologickou metódou sledujúcou účinnosť antibiotík je použitie uhlíkového zväzku elektród

a cyklickej voltametrie (z anglického Carbon Electrode Arrays and Cyclic Voltametry). V tomto prípade sú zahustené bakteriálne kultúry spočiatku inkubované s rôznymi antibiotikami, potom sú pridané oxidačné roztoky kyanoželezitanu a dichlórphenol-indofenolu a následne sú vykonané amperometrické merania použitím uhlíkových elektród. Elektródy zaznamenali amperometrické odozvy prúdu z premeny kyanoželezitanu na kyanoželeznatan za menej ako hodinu, ktoré sú markermi prenosu elektrónov kvôli metabolickej aktivite baktérií a respirácii. Bolo pozorované, že pod inhibičnou koncentráciou antibiotika sa amperometrické prúdy znížili. To umožnilo určenie inhibičnej koncentrácie (IC_{50}) chloramfenikolu u *E. coli*, ktorý potlačil 50 % metabolickej aktivity u baktérii, potenciálne uľahčujúci rýchlu identifikáciu ostatných účinných antimikrobiálnych látok. Použitie vysokej koncentrácie baktérií ($OD \geq 0,1; 1 \times 10^8$), potreba špecializovaných roztokov, vstrebávanie antibiotika samotnou elektródou a pre užívateľa neprístupné dátové výstupy môžu brániť použitiu metódy. Avšak farmaceutický priemysel a vládne organizácie by si mohli osvojiť túto metódu kvôli citlivosti a rýchlosti [25,26].

Nedávno bola popísaná iná štúdia, v ktorej boli použité zlaté nanočastice pokryté dextranom, ktoré sa za prítomnosti uhľohydrátovo-špecifickej zhlukovanej indukujúcej látky (concanavalin A) prejavili rozdielnym zhlukovaním v závislosti na koncentrácii škrobu. Najmä pri vyššej koncentrácii uhľohydrátu bolo pozorované značné zhlukovanie so sprievodným javom veľkých plazmónových posunov, zatiaľ čo pri miernych až nízkych koncentráciách boli pozorované menšie zhlukovania a menej markantné plazmónové posuny. Na základe tohto zistenia boli spočiatku baktérie *E. coli* inkubované dve hodiny v prítomnosti rôznych koncentrácií ampicilínu. Následne boli alikvótne časti týchto bakteriálnych kultúr inkubované so zlatými nanočasticami pokrytými dextranom a látkou concanavalin A. Behom hodiny bolo spektrofotometricky určené, že 2 μ g ampicilínu neinhibovalo rast, zatiaľ čo pri 4 μ g bola dosiahnutá metabolická inhibícia baktérii. Na základe toho bolo zistené, že minimálna inhibičná koncentrácia pre tento kmeň je 8 μ g ampicilínu. Celkový čas detekcie pritom trval 3 hod. [26,27].

Ďalej bola vyvinutá metóda používajúca nanočastice s oxidom železa (z anglického Ironoxide-Nanoparticle-Based Assay) na uľahčenie určenia citlivosti lieku v krvi s magnetickým zoslabením. Boli vymyslené dve odlišné metódy spoliehajúce sa buď na súťaženie, alebo na priamy väzbový formát. Pri súťaživom formáte súťažili nanočastice oxidu železa pokryté dextranom s karbohydrátom v roztoku počas viazania na concanavalin A. Na druhej strane pri priamom väzbovom formáte bol concanavalin A spojený s nanočasticami oxidu železa pokrytými dextranom umožňujúcim spájanie nanočastíc s nevyužitými uhľohydrátmi vo vzorke. Pri prvotných štúdiách nanosenzory oxidu železa uľahčili stanovenie množstva škrobu a monitorovanie bakteriálneho rastu prostredníctvom zmien v spinových relaxačných dobách. Bolo predpokladané, že vzorky s neinhibičnými koncentraciami antibiotika majúce tým nižšie hladiny uhľohydrátov ako výsledok aktívneho metabolizmu u baktérií, mali by ukázať väčšie spinové relaxačné časy uľahčujúce určenie antimikrobiálnej citlivosti aj v nepriehľadnom médiu. Preto vedci určili, či boli rozdielne mikroorganizmy rezistentné

alebo citlivé na ampicilín. Počas 2,5 hod. nanosenzory oxidu železa pokryté dextranom určili, že *E. coli* a *Shigella sonnei* boli citlivé na 8 μ g ampicilínu, zatiaľ čo *Serratia marcescens* bola rezistentná voči tomuto antibiotiku. Tieto výsledky boli potvrdené aj pomocou zákalovej metódy po 24 hod. inkubácii, čo ukazuje, že nanočasticová metóda je rovnako citlivá a spoľahlivá, ale rýchlejšia ako táto referenčná metóda. Tieto zistenia naznačujú, že metódy antimikrobiálnej citlivosti založené na nanotechnológii môžu byť také citlivé a priame, ako tradičné metódy, ale poskytujúce rýchlejšie výsledky, ktoré môžu byť užitočné pri prevencii epidémií a urýchlení vývoja nových liekov [26,28].

Izotermická mikrokalorimetria – IMK (z anglického Isothermal Microcalorimetry) je dynamická technika, ktorá umožňuje meranie produkcie tepla buď ako rýchlosť toku (μ W/jednotkový čas), alebo ako celkový nárast postupom času (Jouly/jednotkový čas) prameniáci z metabolizmu aktívne rastúcich buniek. Pribúdajúci nárast tepla sa všeobecne zhoduje s bežnými krivkami rastu v tom, že sklon a tvar akumulujúcej produkcie tepla korešponduje s klasickou lag, exponenciálnou a stacionárnou fázou. Maximálne hodnoty tepla predstavujú celkové množstvo buniek vytvorených postupom času. Minimálna tepelná inhibičná koncentrácia (z anglického Minimal Heat Inhibition Concentration, MHIC) môže byť definovaná ako najnižšia koncentrácia liečiva, ktorá buď inhibuje 50 % celkovej produkcie tepla, alebo má za následok 50% redukciu rýchlosti toku tepla v závislosti na testovanom liečive. Postup si vyžaduje špecifické IMK prístroje na meranie produkcie tepla s detekčným limitom 0,2 μ W [8].

Použitie IMK na testovanie citlivosti bolo úspešne prispôbené na TCA u baktérií, mykobaktérií vrátane *M. tuberculosis* a húb. Výhody tejto techniky sú nasledujúce: (a) je cenovo dostupná a citlivá, (b) testovanie je realizované v utesnených ampulkách zmiernujúcich bezpečnostné obavy, keď hodnotíme vysoko rizikové organizmy, (c) pasívne monitorovanie, (d) kompletná analýza poskytuje informácie o maximálnej rýchlosti rastu organizmu, aktivity lieku a spomaľuje exponenciálnu fázu rastu (predĺžená lag-fáza) spôsobenú liekom, (e) môže napomôcť pri predpovedaní aktuálnej MIC [8].

Magnetická rotácia guľôčok (z anglického Magnetic Bead Rotation). Keď sú magnetické guľôčky prenesené do otáčavého magnetického poľa, navzájom sa spájajú a zaujmú špecifický rotačný spin. Frekvencia rotácie môže byť ovplyvnená viazaním molekúl, vírusov alebo baktérií. Takže ak sú guľôčky vybavené s ligandom, ktorý špecificky zachytáva bakteriálne bunky, rotácia guľôčok sa mení v okamihu zachytenia a táto zmena môže byť merateľná. Ak budú všetky guľôčky v médiu s kultúrou spojené s jednou alebo dvoma bunkami, znova zaujmú konštantnú rotačnú frekvenciu. Ak sa baktéria začne deliť, rotačná frekvencia sa zmení. Ak je bunkové delenie zabrzdené alebo zablokované antimikrobiálnymi látkami kvôli citlivosti, zmeny sú zastavené. Ak je baktéria rezistentná k použitej antimikrobiálnej látke, nastane zmena v rotačnej frekvencii. Týmto spôsobom môže byť antimikrobiálna rezistencia detegovaná a presne kvantifikovaná [8].

Bol popísaný aj antimikrobiálny test citlivosti založený na raste použitím biosenzorov s asynchrónnou magnetickou ro-

táciou guľôčok. Účinky bakteriálneho rastu na rotáciu a tvar zhluku spájajúcich magnetické mikroguľôčky v rotačnom magnetickom poli môžu byť sledované v tomto systéme postupom času. Rotačná perióda (RP) narastá, keď sa organizmy množia a pripájajú ku guľôčkam pokrytým špecifickou protilátkou pre daný organizmus, alebo ak je viskozita v prostredí rastu zmenená. Pridanie antimikrobiálnych látok v narastajúcich koncentráciách zabraňuje nárastu RP postupom času. Tento proces môže byť sledovaný priamo pomocou osvetľovania kultivačného média (vo forme visiacej kvapky) s diódou emitujúcou svetlo alebo laser. Táto visiača kvapka tiež slúži ako šošovka vytvárajúca zväčšenie až do 100x, takže štruktúra a rotačná intenzita guľôčkových agregátov môže byť sledovaná mikroskopicky. Po pridaní streptomycínu a gentamicínu do Mueller-Hinton bujónu obsahujúceho magnetické guľôčky s protilátkami predbežne viazanými k štandardizovanému inokulu *E. coli* boli zmeny v RP pozorované mikroskopicky postupom času a zaznamenané. Ako sa očakávalo, RP sa zvýšila vzhľadom k bakteriálnemu rastu, pričom pri roztokoch obsahujúcich vyššie koncentrácie antibiotika bolo názorne pozorované najnižšie zvyšovanie. Táto metóda môže byť prevedená na nanolitrové objemy obsahujúcich 50 alebo menej bakteriálnych buniek na kvapku, čo v podstate skráti trvanie testu [29].

Testovanie v mikrokvapôčkach (z anglického Testing in Microdroplets). Metóda je založená na sledovaní metabolickej aktivity a životaschopnosti bakteriálnych buniek v mikro alebo nanokvapôčkach. Bol vyvinutý systém pozostávajúci z kvapôčok (100 nanolitrov) obsahujúcich 10^3 baktérií na kvapku a rozdielných koncentrácií antibiotík. Sledovaním kvapôčok použitím epifluorescencie môžu byť krivky rastu monitorované pri každej koncentrácii liečiva. Nedávno boli pripravené také kvapôčky, ktoré obsahovali iba jednu bakteriálnu bunku. Táto technológia môže byť miniaturizovaná a ľahko viacnásobne využitá vzhľadom na počet testovaných antibiotík. Trvanie testu môže byť také krátke ako je jeden alebo niekoľko reprodukčných cyklov baktérie. Samozrejme, predtým ako sa tento prístup vyhodnotí ako rutinný TCA prostriedok, bude nutné určenie technickej reprodukovateľnosti a vývoj adekvátnej referenčnej MIC databázy [8].

Aplikačné technológie vzdialenejšej budúcnosti

Niekoľko inovačných TCA metód bolo navrhnutých a prezentovaných za minulú dekádu, avšak väčšina z nich je ešte ďaleko od zavedenia do rutinnej klinickej mikrobiológie. Niektoré, vrátane bakteriofágovej stratégie, boli úspešne upravené na testovanie *M. tuberculosis* použitím rekombinantných fágov obsahujúcich gény luciferázy. Bolo ukázané, že luciferázový test môže byť vykonaný za nízke ceny do dvoch dní a môže byť úspešne použitý v laboratóriách rozvojových krajín. Bohužiaľ, tento inovačný prístup nebol všeobecne akceptovaný v diagnostických mikrobiologických laboratóriách, pravdepodobne kvôli kontaminácii a problémom s fágovou rezistenciou [8].

Real-time mikroskopovanie je jednou z inovačných technológií, ktoré môžu byť aplikované na TCA v nie príliš vzdialenej budúcnosti. Kamerové systémy s vysokým rozlíšením boli komercializované a to ukazuje vysoký stupeň účinnosti. Táto technológia bola vyvinutá na použitie mi-

krokolónií a sériového fotografovania vzhľadom na prítomnosť alebo neprítomnosť antibiotík. Jedná sa o sledovanie bakteriálneho delenia na bunkovej úrovni za prítomnosti alebo neprítomnosti antibiotík. Takéto technológie môžu napomôcť pri vývoji jednoduchých TCA testov určených pre baktérie z pozitívnych krvných kultivačných nádob. To poukazuje na to, že jednoduchý a staromódny test môže byť stále prispôsobený na systémy, ktoré lepšie slúžia potrebám pacientov [8].

Detekcia apoptických markerov (zložiek produkovaných pri programovanej bunkovej smrti). Bakteriálna bunková smrť spôsobená použitím rôznych baktericídnych antibiotík počas liečby je sprevádzaná niekoľkými biochemickými markermi apoptózy, vrátane fragmentácie DNA, chromozómového zrážania, vystavenie fosfatidylserínu na vonkajšom liste plazmatickej membrány a straty membránového potenciálu [30]. Ďalej bolo zistené, že baktericídne antibiotiká podporujú produkciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré sú dôležité apoptické regulátory u mnohobunkových, ako aj jednobunkových eukaryotov [31–33]. RecA, multifunkčný proteín rozhodujúci pre zachovávanie DNA a opravu, bol tiež identifikovaný ako ďalší uchádzač zapojený do antibiotikom indukovaného apoptického zániku baktérie. V súlade s týmto zistením bolo preukázané že, RecA zohráva dôležitú úlohu v smrti podobnej apoptóze (z anglického Apoptosis-Like Death) u *E. coli* [34]. Predpokladá sa, že identifikácia a detailná charakterizácia dráh bakteriálnej programovanej bunkovej smrti (z anglického Programmed Cell Death) sprostredkovanej liekom bude užitočná na pochopenie a znižovanie nárastu bakteriálnych kmeňov rezistentných na dostupné antibiotické liečby. Preto objasnenie prepojenia odlišných dráh programovanej bunkovej smrti môže napomôcť pri vývoji nových antibiotických stratégií [35].

Celogenómové sekvenovanie (z anglického Whole-Genome Sequencing). Pokroky v sekvenčných technológiách DNA umožnili zoradiť celé bakteriálne genómy extrémne rýchlo. Tieto metódy spolu s bioinformatickými nástrojmi, ktoré môžu rýchlo zhromaždiť a analyzovať obrovské množstvo dát získaných z týchto sekvenčných chodov, otvárajú možnosť použitia týchto metód na detekciu rezistencie na antibiotiká. Bolo popísaných množstvo štúdií popisujúcich celogenómové sekvenovanie malého množstva klinických izolátov za účelom charakterizovania genetických determinantov antibiotickej rezistencie. Cieľom týchto štúdií bolo primárne charakterizovať kmene so zaujímavými profilmi fenotypovej rezistencie. V jednej štúdií bolo použité celogenómové sekvenovanie na charakterizovanie profilov rezistencie u 200 bakteriálnych izolátov zo 4 bakteriálnych druhov k rôznym antibiotikám a výsledky boli porovnané s výsledkami získanými testovaním fenotypovej citlivosti. Bola pozorovaná vysoká zhoda (takmer 100%) medzi oboma technikami, čo poukazuje na to, že dáta získané z genómových sekvencií môžu v niektorých prípadoch dobre nadväzovať na fenotypovú rezistenciu. Hlavnými nevýhodami metódy sú dlhý čas sekvenovania a zvýšené náklady. Hoci v jeho súčasnej forme nemusí byť vhodné na rutinné testovanie, celogenómové sekvenovanie ukázalo svoj úžitok v sledovaní výskytu klinicky významných kmeňov (MRSA a *E. coli* O104:H4). Bezpochyby, genómové sekve-

novanie bude stále viac používané v laboratóriách klinickej mikrobiológie, hneď ako poklesnú ceny za sekvenovanie a vzrastie rýchlosť sekvenovania a analýzy. Avšak treba zmeniť, že DNA sekvenovanie sa spolieha na identifikáciu genetických determinantov rezistencie, čo môže obmedziť schopnosť detegovať nové a necharakterizované mechanizmy rezistencie [3]. Napriek tomu sa predpokladá, že sekvenovanie novej generácie (z anglického Next-Generation Sequencing – sekvenovanie celobunkovej DNA a RNA), RNA sekvenovanie (z anglického RNA Sequencing – štúdium a definícia rozdielov v génovej expresii prostredníctvom sekvenovania), sekvenovanie transkriptómu a celogénové sekvenovanie môžu poskytnúť v blízkej budúcnosti nové možnosti na predikciu rezistencie [8].

Zhrnutie

Tento prehľad poskytuje zhrnutie existujúcich technológií, ktoré môžu byť aplikované na diagnózu infekcií spôsobených mnohonásobne rezistentnými baktériami. Konvenčné TCA metódy majú svoje diagnostické nedostatky: sú všeobecne časovo náročné a výsledky sa dostavia neskoro. Na druhej strane sú však veľmi spoľahlivé, dobre uznávané a cenovo prijateľné. Každá popísaná metóda sa usiluje hlavne o skrátenie času potrebného na detekciu rezistencie v bakteriálnych patogénoch, avšak v mnohých prípadoch zostáva ešte overiť, či tieto prístupy poskytujú dostačujúcu citlivosť a špecifickosť. Musia byť tiež vykonané mnohé štúdie poskytujúce informácie na klinické potvrdenie týchto prístupov. Jedno z hlavných obmedzení týchto metód je nesúhlas medzi prítomnosťou determinantu rezistencie a fenotypovou rezistenciou. Treba tiež zvážiť, ako sa inováčné metódy popasujú s novými alebo necharakterizovanými mechanizmami rezistencie, pretože neschopnosť testu identifikovať rezistenciu, bude viesť ku chybám. Ale za predpokladu potenciálnych výhod súvisiacich so zlepšovaním výsledkov u pacientov (napríklad znížením úmrtnosti, chorobnosti, nákladov spojených so zdravotnou starostlivosťou o zdravie a znížením časového úseku, počas ktorého je aplikovaná empirická liečba) pokračujúci vývoj týchto prístupov je zaručený. Kľúčové použítie techniky bude určené na skorú detekciu mnohonásobne rezistentných organizmov pri vážnych infekciách (napr. sepsa). Navyše, tieto nové molekulové technológie budú tiež viesť k lepšiemu pochopeniu patogenézy chorôb. Nie sme si však istí, ktorá metóda bude najvýhodnejšia. Môžeme však vidieť, že niekoľko nových TCA technológií už klope na dvere [3].

Podakovanie

Podporené výskumným zámerom CZ.1.07/2.3.00/30.0004.

Literatúra

- Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1415–1418.
- Luna CM, Aruj P, Niederman MS, et al. Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J.* 2006;27:158–164.
- Pulido MR, Garcia-Quintanilla M, Martin-Pena R, et al. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:2710–2717.
- Du Z, Yang R, Guo Z, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 2002;74:5487–5491.
- Camara JE, Hays FA. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389:1633–1638.
- Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 50:2918–2931.
- Wybo I, De Bel A, Soetens O, et al. Differentiation of *cfiA*-negative and *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1961–1964.
- van Belkum A, Dunne WM, Jr. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2018–2024.
- Hrabak J, Walkova R, Studentova V, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3222–3227.
- Hrabak J, Studentova V, Walkova R, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2441–2443.
- Syrms MW, Moser RJ, Whiley DM, et al. Comparison of a multiplexed MassARRAY system with real-time allele-specific PCR technology for genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 17:1804–1810.
- Ikraynikova LN, Shitikov EA, Zhivankova DG, et al. A MALDI TOF MS-based minisequencing method for rapid detection of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* 2008;75:385–391.
- Hujer KM, Hujer AM, Endimiani A, et al. Rapid determination of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1436–1442.
- Cai JC, Hu YY, Zhang R, et al. Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2179–2182.
- Choi J, Jung YG, Kim J, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing by tracking single cell growth in a microfluidic agarose channel system. *Lab Chip.* 13:280–287.
- Barczak AK, Gomez JE, Kaufmann BB, et al. RNA signatures allow rapid identification of pathogens and antibiotic susceptibilities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:6217–6222.
- Sangurdekar DP, Srien F, Khodursky AB. A classification based framework for quantitative description of large-scale microarray data. *Genome Biol.* 2006;7:R32.
- Ren L, Rahman MS, Humayun MZ. *Escherichia coli* cells exposed to streptomycin display a mutator phenotype. *J Bacteriol.* 1999;181:1043–1044.
- Lopez E, Elez M, Matic I, et al. Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2007;64:83–93.
- Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61:377–392.
- Cirz RT, Chin JK, Andes DR, et al. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol.* 2005;3:e176.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* 2007;130:797–810.
- Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, et al. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science.* 2004;305:1629–1631.
- Perez-Capilla T, Baquero MR, Gomez-Gomez JM, et al. SOS-independent induction of *dinB* transcription by beta-lactam-mediated inhibition of cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2005;187:1515–1518.
- Mann TS, Mikkelsen SR. Antibiotic susceptibility testing at a screen-printed carbon electrode array. *Anal Chem.* 2008;80:843–848.
- Kaittanis C, Santra S, Perez JM. Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62:408–423.
- Nath S, Kaittanis C, Tinkham A, et al. Dextran-coated gold nanoparticles for the assessment of antimicrobial susceptibility. *Anal Chem.* 2008;80:1033–1038.
- Kaittanis C, Nath S, Perez JM. Rapid nanoparticle-mediated monitoring of bacterial metabolic activity and assessment of antimicrobial susceptibility in blood with magnetic relaxation. *PLoS One.* 2008;3:e3253.
- Sinn I, Albertson T, Kinnunen P, et al. Asynchronous magnetic bead rotation microviscometer for rapid, sensitive, and label-free studies of bacterial growth and drug sensitivity. *Anal Chem.* 2012;84:5250–5256.
- Dwyer DJ, Camacho DM, Kohanski MA, et al. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Mol Cell.* 46:561–572.
- Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, et al. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 2007;3:91.
- Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, et al. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol.* 2004;164:501–507.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000;5:415–418.
- Erental A, Sharon I, Engelberg-Kulka H. Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: an apoptotic-like death is inhibited by the *mazEF*-mediated death pathway. *PLoS Biol.* 10:e1001281.
- Carmona-Gutierrez D, Kroemer G, Madeo F. When death was young: an ancestral apoptotic network in bacteria. *Mol Cell.* 2012;46:552–554.

Metódy fenotypového dôkazu New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) u *Klebsiella pneumoniae* izolovaných na Slovensku

E. SCHRÉTEROVÁ¹, V. TAKÁČOVÁ¹, M. NIKŠ², L. PASTVOVÁ¹, L. TOMČO³, L. SIEGFRIED⁴

¹Ústav lekárskej mikrobiológie a klinickej mikrobiológie UNLP Košice,

²Národné referenčné centrum pre sledovanie rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká,

³Nemocničná hygienická služba UNLP Košice,

⁴Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie LF UPJŠ a UNLP Košice

SÚHRN

Schréterová E., Takáčová V., Nikš M., Pastvová L., Tomčo L., Siegfried L.: **Metódy fenotypového dôkazu New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) u *Klebsiella pneumoniae* izolovaných na Slovensku**

Cieľ práce: Cieľom tejto práce bolo popísať prvý záchyt a fenotypový dôkaz New Delhi metallo-beta-laktamázy produkovanej *Klebsiella pneumoniae* u pacientov na Slovensku.

Materiál a metódy: V období od 27. 10. 2012–22. 1. 2013 sme pomocou skríningových testov izolovali u 5 pacientov 25 izolátov *Klebsiella pneumoniae*, u ktorých boli MIC meropenemu ≥ 32 mg/L a MIC ertapenemu ≥ 4 mg/L. Všetky izoláty sme ďalej testovali pomocou Modifikovaného Hodge testu, kombinovaného diskového testu s EDTA, dvojitého diskového testu synergie s EDTA a MBL E-testu. Na potvrdenie produkcie metalo- β -laktamázy a jej bližšiu identifikáciu sme izoláty odoslali do Národného referenčného centra pre sledovanie rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká pri Úrade verejného zdravotníctva Slovenskej republiky.

Výsledky: Všetky izolované izoláty boli vo všetkých fenotypových testoch pozitívne. U prvoizolovaného kmeňa bola pomocou PCR amplifikácie a následného sekvenovania a porovnania sekvencie s databázou Genbank, dokázaná produkcia New Delhi metalo-beta-laktamázy (NDM-1).

Záver: Podľa našich vedomostí ide o prvý záchyt NDM-1 u *Klebsiella pneumoniae* v Slovenskej republike. Vďaka zavedeniu prísnych hygienicko-epidemiologických opatrení sme ku dnešnému dňu (31. 1. 2014) ďalšie šírenie alebo nový výskyt NDM-1 karbapenemázy u pacientov v Univerzitnej nemocnici Louisa Pasteura Košice nezaznamenali.

Kľúčové slová: karbapenemázy, karbapeném rezistentné enterobaktérie, NDM-1, fenotypové testy, dôkaz

SUMMARY

Schréterová E., Takáčová V., Nikš M., Pastvová L., Tomčo L., Siegfried L.: **Methods of phenotypic determination of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Slovakia**

Objectives: Reported is the first isolation and phenotypic determination of *Klebsiella pneumoniae* producing New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) isolated from patients in the Slovak Republic.

Material and methods: Between 27 October 2012 and 22 January 2013, twenty-five isolates of *Klebsiella pneumoniae* collected from 5 patients were identified with MIC of meropenem ≥ 32 mg/L and MIC of ertapenem ≥ 4 mg/L in screening tests. Next, all isolates were assessed with the modified Hodge test, combined disk test with EDTA, double disk synergy test with EDTA and MBL E-test. To confirm production of MBL in isolated strains of *Klebsiella pneumoniae*, all strains were sent to the National Reference Center for Antibiotic Resistance in Bratislava.

Results: All strains were positive in all phenotypic tests. In the first carbapenem-resistant isolate, NDM-1 production was confirmed by PCR amplification, sequencing and comparison with the GenBank.

Conclusions: To the best of our knowledge, this is the first case of isolation of NDM-1 from *Klebsiella pneumoniae* in the Slovak Republic. As of 31 January 2014, with well-established and strict epidemiological and preventive measures, there was no further spread or another outbreak of NDM-1 producing Enterobacteriaceae in Louis Pasteur University Hospital in Košice.

Keywords: carbapenemases, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, NDM-1, phenotypic determination, evidence

Klin mikrobiol inf lék 2014; 20(3):79–84

Adresa: MUDr. Eva Schréterová, Cottbuská 3, 040 01 Košice, Slovenská republika, e-mail: eva.kendrovska@gmail.com

Došlo do redakcie: 7. 4. 2014

Prijato k tisku: 29. 8. 2014

Úvod

Narastajúca rezistencia proti antibiotikám u gramnegatívnych baktérií a postupný nárast počtu multirezistentných a neskôr aj panrezistentných gramnegatívnych pôvodcov závažných ochorení sa stal celosvetovým problémom. Postupná strata účinnosti cefalosporínov, fluorochinolónov a aminoglykozidov vyvolala v ostatnom období nárast spotreby karbapenémov, čo sa odrazilo aj v novom fenoméne – objavení sa enterobaktérií rezistentných proti karbapenémom. Takýto vývoj potvrdzuje aj štúdia z Grécka, kde stúpil podiel kmeňov necitlivých proti karbapenémom z menej ako 1 % v roku 2001 na 20 % v roku 2006 [1]. Talianska skupina, ktorá sledovala klebsiely rezistentné proti karbapenémom, zistila v období 1. 1. 2009–30. 4. 2012 nárast podielu necitlivých kmeňov z 2 % v roku 2009 na 19 % v roku 2012 [2].

Najčastejšou príčinou rezistencie proti karbapenémom je tvorba karbapenemázy, v menšej miere sa na zníženej citlivosti proti karbapenémom uplatňujú aj zmeny v štruktúre bunkovej membrány.

Gény kódujúce rezistenciu proti karbapenémom môžu byť umiestnené na chromozómoch alebo sú v génových kazeťoch na mobilných génových elementoch. Okrem génov kódujúcich rezistenciu proti karbapenémom sa pomocou mobilných génových elementov prenáša rezistencia aj proti iným antibiotikám, najčastejšie aminoglykozidom a chinolónom. Pre súčasnú prítomnosť rôznych mechanizmov rezistencie, sú takéto kmene zvyčajne citlivé len na kolimycín.

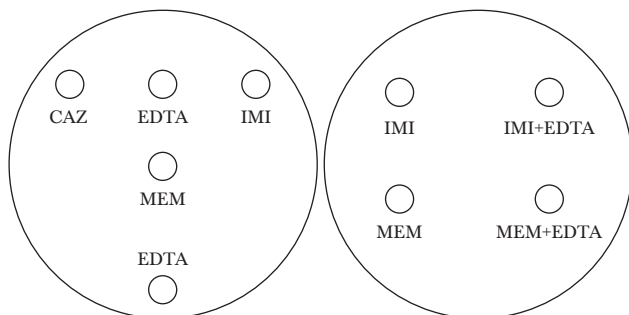
Karbapenemázy sú v klasifikácii podľa Amblera zaradené do tried A, B a D [3]. V Amblerovej triedach A a D sa nachádzajú serínové karbapenemázy, ktorých aktivita je viazaná na serínový zvyšok v aktívnom mieste enzýmu. Tieto enzýmy hydrolyzujú všetky beta-laktámové liečivá. V triede B sa nachádzajú takzvané metalo- β -laktamázy (MBL), ktoré majú vo svojom aktívnom mieste dvojmocný zinok. Do substrátového spektra MBL patria penicilíny, cefalosporíny a karbapenémy. Nehydrolyzujú aztreonam a inhibované sú chelátormi dvojhvalentných kationov ako napríklad EDTA a kyselina dipikolínová.

Obr. 1

Schématické znázornenie rozloženia diskov pre testovanie produkcie karbapenemázy

Vľavo: Rozloženie diskov pri DDST.

Vpravo: Rozloženie diskov pri kombinovanom teste.



Medzi najčastejšie izolované MBL u enterobaktérií patria IMP (angl. Imipenase), VIM (Verona imipenase), NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase), SPM-1 (Sao Paulo metallo-beta-lactamase), GIM-1 (German imipenase), SIM-1 (Seoul imipenase). K celosvetovo rozšíreným MBL patria IMP, VIM, NDM, zatiaľ čo SPM-1, GIM-1, SIM-1 neprekročili hranice štátu, v ktorom boli pôvodne izolované [4].

Vyhľadávanie producentov karbapenemázy je rozhodujúce z hľadiska racionalizácie antibiotickej terapie a kontroly šírenia rezistencie proti karbapenémom. Na vyhľadávanie producentov karbapenemázy slúžia skriningové testy, ktorých breakpointy určuje Európska komisia pre testovanie antibiotickej citlivosti (EUCAST) (*tabuľka 1*) [5]. Každý kmeň, pozitívny v skriningových testoch, je nutné potvrdiť. Základom konfirmačného testu produkcie karbapenemázy je dôkaz štiepenia príslušného substrátu enzýmom extrahovaným z baktérie. Techniky môžu byť napríklad spektrofotometrické, chromatografické atď. Testy, ako napríklad MALDI-TOF [6] a CarbaNP [7], dokážu so špecifickosťou blízkou molekulárnym testom určiť prítomnosť teoreticky akejkolvek karbapenemázy do 2 hodín. Výhodou týchto testov je, že zachytia aj nové enzýmy, ktorých molekulárna detekcia nie je ešte možná.

V bežnej klinickej praxi sa stretávame s tzv. "klinickými fenotypovými konfirmačnými testami", medzi ktoré patria Modifikovaný Hodge test a testy synergie [8–11]. Modifikovaný Hodge testom (MHT) vieme detekovať difuzibilné karbapenemázy. Pomocou testov synergie dokážeme sledovať inhibíciu karbapenemázy pomocou špecifického inhibítora. Pre MBL je špecifickým inhibítorom kyselina dipikolínová a EDTA.

V súčasnosti už EUCAST MHT na identifikáciu izolátov produkujúcich karbapenemázy neodporúča. Dôvodom je vysoká falošná pozitivita pri kmeňoch produkujúcich beta-laktamázy typu AmpC, resp. ESBL v kombinácii so zníženou expresiou porínov [5]. Podobne Girlich so spoluautorami [12] uvádza častú falošnú negativitu tohto testu pri identifikácii NDM-1 enzýmov.

Pri testoch synergie využívajúcich EDTA Giske a spol. 2011 popisujú falošnú pozitivitu u 4 z 34 KPC produkujúcich *Klebsiella pneumoniae*, u 1 z 9 izolátov *Klebsiella pneumoniae* produkujúcich CTX-M so stratou porínov a u 4 z 9 OXA-48 produkujúcich *Klebsiella pneumoniae*. Citlivosť testov synergie využívajúcich EDTA bola v našom prípade 100%. Pri kombinovanom diskovom teste s kyselinou dipikolínovou s obsahom 1 000 μ g, dosiahli Giske a spol. citlivosť a špecifickosť 100 %. Žiadna interakcia alebo synergie s inými mechanizmami rezistencie zistená nebola [10].

NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase)

V roku 2008 sa u *Klebsiella pneumoniae* objavila plazmidovo viazaná metalo- β -laktamáza (NDM-1), ktorá sa v krátkom čase rozšírila do celého sveta.

NDM bola prvýkrát detekovaná u *Klebsiella pneumoniae* v roku 2008 vo Švédsku u pacienta predtým liečeného v Indii [13]. Gén *bla*_{NDM-1} sa nachádza na konjugatívnom plazmide, čo uľahčuje jeho šírenie. Problémom býva súčasný prenos rezistencie proti iným antibiotikám (aminoglyko-

Tabulka 1
Klinické breakpointy a skrínigové hodnoty pre enterobaktérie produkujúce karbapenemázy (EUCAST)

Karbapeném	MIC (mg/L)		Diskový difúzny test s 10 µg diskami Priemer inhibičnej zóny (v mm)	
	Citlivý/Intermediárny breakpoint	Skrínigová hranica	Citlivý/Intermediárny breakpoint	Skrínigová hranica
Meropeném ¹	≤ 2	> 0,12	≥ 22	< 25 ²
Imipeném ³	≤ 2	> 1	≥ 22	< 23
Ertapeném ⁴	≤ 0,5	> 0,12	≥ 25	< 25

¹Najlepšia proporcionalita medzi citlivosťou a špecifickosťou.

²V niektorých prípadoch môže inhibičná zóna producentov OXA-48 dosahovať až 26 mm. V krajinách, kde sa producenti OXA-48 vyskytujú endemicky, sa odporúča skrínigová hranica < 27 mm aj napriek zníženej špecifícite testu.

³Imipeném sa pre jeho nízku diskriminačnú schopnosť neodporúča ako samostatné skrínigové antibiotikum.

⁴Ertapeném má vysokú citlivosť, ale nízku špecificitu, preto sa na rutinné testovanie neodporúča.

zidy) spolu s génom blaNDM-1. Od roku 2010 boli opísané ďalšie varianty NDM-1. V Egypte bol u kmeňa *Acinetobacter baumannii* stanovený variant NDM-2 [14]. Pri izoláte *Escherichia coli*, izolovanom od pacienta v Indii, bol zachytený variant NDM-4, ktorého karbapenemázová aktivita je porovnateľná s NDM-1 [15]. Nedávno identifikovaný variant NDM-5, produkovaný kmeňom *Escherichia coli*, bol izolovaný u pacienta, ktorý bol hospitalizovaný v Indii [16].

V článku popisujeme prvý záchyt NDM-1 u *Klebsiella pneumoniae* na Slovensku.

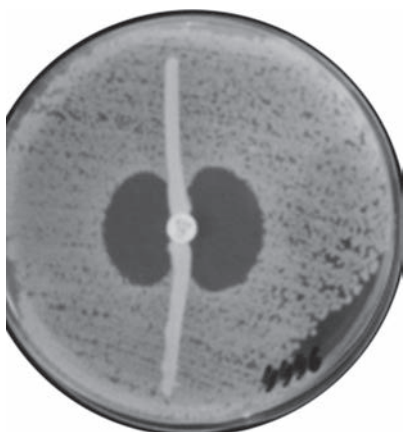
Materiál a metódy

V období od 27. 10. 2012–22. 1. 2013 sme pomocou skrínigových testov, založených na stanovení MIC meropené-

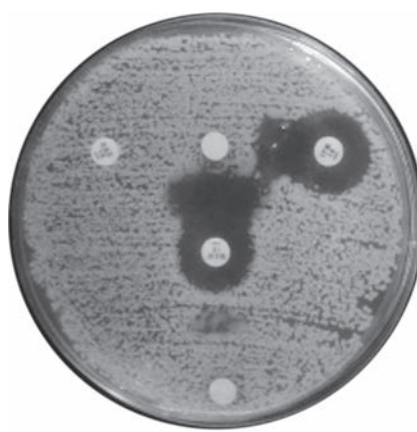
mu, izolovali 25 izolátov *Klebsiella pneumoniae*, s MIC meropenému ≥ 32mg/L a MIC ertapenému ≥ 4mg/L. Tieto izoláty boli izolované od 5 pacientov hospitalizovaných na rôznych oddeleniach UNLP Košice. Ďalšia charakteristika izolátov je uvedená v tabulke 2.

Prvým pacientom, u ktorého bola izolovaná *Klebsiella pneumoniae* s rezistenciou proti karbapenémom bol pacient číslo 1, ktorý bol prijatý na Klinikú úrazovej chirurgie s poúrazovým epidurálnym krvácaním. Následne bol preložený na Neurochirurgickú kliniku, kde bol hospitalizovaný aj pacient číslo 5. Pacient číslo 1 bol neskôr preložený na Klinikú anesteziológie a intenzívnej medicíny (KAIM), kde boli v čase jeho hospitalizácie prijatí aj pacienti číslo 2 a 3. Pacient číslo 4 bol spolu s pacientom číslo 2 hospitalizovaný na Klinike hematológie a onkohematológie.

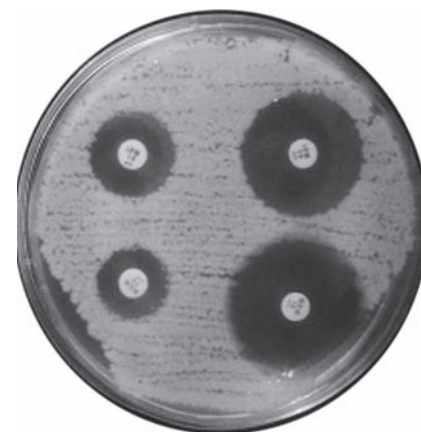
Obr. 2
Dôkaz produkcie karbapenemáz pomocou MHT (foto: Schréterová, 2012)



Obr. 3
Fenotypový dôkaz produkcie metalo-β-laktamáz pomocou DDST. DDST s rozšírenými inhibičnými smerom k disku s EDTA (foto: Schréterová, 2012)



Obr. 4
Fenotypový dôkaz produkcie metalo-β-laktamáz pomocou kombinovaného testu. Vpravo hore disk s kombináciou imipeném+ EDTA, vpravo dole meropenem+ EDTA. (foto: Schréterová, 2012)



Tabuľka 2
Charakteristika izolátov so suspektnou produkciou karbapenemáz

P. č.	Rok narodenia	Materiál	Oddelenie, na ktoré boli pacienti prijatí	MIC mg/L												
				CTX	MFP	PIT	SPZ	ETP	MEM	G10	TOB	AMI	COT	TIG	COL	CIP
1.	1958	HDC (2x nos, 2x hrdlo, jazyk)	KÚCH	> 32	32->32	64->64	64->64	> 4	32->32	0,25-4	16->16	32->64	0,5->4	2-4	0,25-2	> 4
		DDC (2x BAL, spútum)		> 32	> 32	> 64	64->64	> 4	> 32	0,5-4	16->16	64	0,5->4	2	0,25-1	> 4
		VKA (6x TS, ET)		> 32	> 32	64->64	32->64	> 4	32->32	0,5-2	16->16	32->64	0,5->4	2-4	0,25-2	> 4
		inguína		> 32	> 64	> 64	> 64	> 4	> 32	0,5	> 16	> 64	> 4	2	2	> 4
2.	1983	VKA (2x TS)	KAIM	> 32	32->32	> 64	> 64	> 4	> 32	0,5	16->16	32	> 4	2-4	0,5-1	> 4
3.	1941	HDC (nos, 2x ústna dutina, hrdlo)	KAIM	> 32	32->32	> 64	> 64	> 4	> 32	0,5-2	> 16	64	> 4	2	0,5-2	4->4
		rektum		> 32	> 32	> 64	> 64	> 4	> 32	0,25	8	16	> 4	1	0,5	> 4
4.	1942	nos	KHaOKH	> 32	> 32	> 64	> 64	> 4	> 32	1	> 16	64	0,5	1	0,5	> 4
5.	1973	VKA (TS)	Neurochirurgická klinika	> 32	> 64	> 64	> 64	> 4	> 32	0,5	> 16	32	> 4	2	1	> 4

HDC – horné dýchacie cesty, DDC – dolné dýchacie cesty, BAL – bronchoalveolárna laváž, VKA – výter z kanyly, TS – tracheostomická kanyla, ET – endotracheálna kanyla, KÚCH – Klinika úrazovej chirurgie, KAIM – Klinika anesteziologicko-intenzívnej medicíny, KHaOKH – Klinika hematológie a onkohematológie, MIC – minimálna inhibičná koncentrácia, CTX – cefotaxim, MFP – cefepim, PIT – piperacilín + tazobaktám, SPZ – cefoperazon + sulbaktám, ETP – ertapenem, MEM – meropenem, G10 – gentamicín, TIG – tobramycín, AMI – amikacín, COT – trimetoprim + sulfametoxazol, TIG – tigecklín, COL – kolimycín, CIP – ciprofloxacín

V ďalšom fenotypovom testovaní sme pracovali s modifikovaným testom podľa Hodge (MHT), kombinovaným diskovým testom s EDTA, dvojitým diskovým testom synergie (DDST) s EDTA a MBL E-testom.

MHT sme pripravili podľa odporúčaní normy CLSI z roku 2009 [8].

Pri DDST sme platňu inokulovali testovaným kmeňom podľa štandardných metód na testovanie diskovej citlivosti. Na inokulovanú platňu sme umiestnili blank disk s priemerom 6 mm s pridaním 10 µL EDTA na filtračný papier Whatmann č. 3 (zásobný roztok 0,1M EDTA s pH 7,8 upraveným pomocou NaOH) a do vzdialenosti 25 mm od centra disku sme umiestnili disk obsahujúci 10 µg imipenemu (IMI), disk obsahujúci 10 µg meropenemu (MEM) a disk obsahujúci 10 µg ceftazidimu (CAZ). Pre kontrolu prípadného bakteriostatického účinku EDTA sme na platňu umiestnili aj samostatný blank disk s obsahom 10 µg 0,1M EDTA [9] (*obr. 1*).

Na testovanie kmeňov pomocou kombinovaného diskového testu sme použili disky s obsahom IMI+ EDTA a MEM+ EDTA, ktoré sme pripravili pridaním 10 µL 0,1M EDTA ku komerčne dodávaným diskom obsahujúcim 10 µg meropenemu a 10 µg imipenemu a nechali sme ich 30 minút zaschnúť. Takto pripravené disky obsahujúce MEM+ EDTA si skladovaním pri +4 °C uchovávajú stálosť aspoň 24 týždňov. Disky s obsahom IMI+ EDTA si pri teplote +4 °C uchovávajú stálosť 12 týždňov [11]. Po štandardnom naočkování testovaného kmeňa na MHA sme na platňu umiestňovali disky IMI, IMI+ EDTA a MEM a MEM+ EDTA (*obr. 1*).

Pri testovaní pomocou MBL E-testu sme postupovali podľa odporúčaní výrobcu.

Výsledky

Ako pozitívny výsledok MHT sa hodnotí deformácia inhibičnej zóny. Všetky testované izoláty (n = 25) mali MHT pozitívny (*obr. 2*).

U všetkých testovaných izolátov bolo zreteľné rozšírenie inhibičných zón smerom k disku s EDTA (*obr. 3*).

Všetky testované izoláty vykazovali významné rozšírenie inhibičných zón pri diskoch s kombináciou imipenem+

EDTA a meropenem+ EDTA. Toto rozšíření bolo väčšie ako 5mm v porovnaní s inhibičnými zónami diskov imipenemu a meropenemu (obr. 4).

Pri testovaní pomocou MBL E-testu bola zreteľná deformácia inhibičnej zóny (obr. 5) u všetkých testovaných izolátov.

Na bližšie určenie typu metalo- β -laktamázy sme izoláty odoslali do Národného referenčného centra pre sledovanie rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká pri Úrade verejného zdravotníctva Slovenskej republiky (NRC pre ATB ÚVZ SR). Produkcia karbapenemázy bola dokázaná pomocou CarbaNP testu [7]. Amplifikáciou génu bla NDM, jeho sekvenovaním (MacroGen Inc., Soul, Južná Kórea) a následným porovnaním s databázou GenBank bola metalo- β -laktamáza identifikovaná ako NDM-1 [17]. Podľa našich vedomostí ide o prvý záchyt NDM-1 u *Klebsiella pneumoniae* u pacientov v Slovenskej republike.

Diskusia a záver

Na vzrastajúcom počte rezistentných kmeňov sa spolupodieľa niekoľko faktorov. Za najvýznamnejší sa považuje vplyv selekčného tlaku antibiotík, ktorý vedie k selekcii životaschopných rezistentných mutantov. Rezistenciu je najúčinnejšie eliminovať, kým je jej výskyt lokálny. Pri celosvetovom rozšírení je to už skoro nemožné. Základom prevencie lokálneho šírenia rezistencie je dodržiavanie hygienického štandardu nielen pri ošetrovaní pacientov s porušenou ochrannou bariérou pre vstup infekcie, ale aj u kolonizovaných pacientov.

Na vyhľadávanie izolátov rezistentných proti karbapenému u kolonizovaných pacientov sa môžu využiť selektívne chromogénne médiá ako napríklad CHROMagar KPC (CHROMagar, Paris, FR), CRE Brilliance (Thermo Fisher Scientific, UK), alebo Supercarba médium (CSC, Bicêtre, Pr. P. Nordmann).

U každého izolátu je nutné produkciu karbapenemáz potvrdiť. Pri klinických konfirmačných testoch sa môžu využiť testy synergie, pri ktorých sa využívajú špecifické inhibítory. Pre karbapenemázy triedy A je špecifickým inhibítom kyselina boronová, metalo-beta laktamázy sú inhibované dipikolínovou kyselinou alebo EDTA. Pre karbapenemázy triedy D zatiaľ nebol špecifický inhibitor stanovený. Na produkciu OXA-48 sa dá usudzovať pri vysokej rezistencii proti temocilínu.

Najlepšie validovanými testami sú kombinované diskové testy, ktoré sú aj komerčne dostupné [10,18]. Produkcia karbapenemázy testovaným kmeňom sa prejaví zväčšením priemeru inhibičnej zóny disku s obsahom 10 μ g meropenemu a špecifickým inhibítom v porovnaní s priemerom inhibičnej zóny disku s obsahom 10 μ g meropenemu bez špecifického inhibítora. Najvyššia citlivosť a senzitivita testu sa dosiahne pri rozdieli ≥ 5 mm.

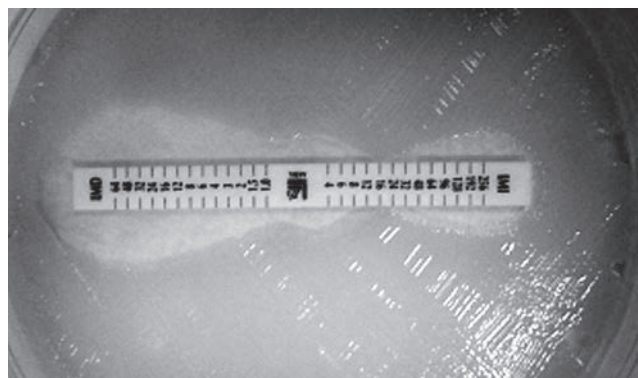
Pri zaradení oxacilínu do testovacieho algoritmu je možné odlíšiť hyperprodukciiu AmpC a stratu porínov od produkcie karbapenemáz.

Nevýhodou týchto fenotypových testov je inkubačná doba 16–18 hodín. Rýchlejšiu alternatívu s vysokou citlivosťou a špecifickosťou poskytujú testy, v ktorých sa detekuje prítomnosť karbapenemázy priamo v bunkovom extrakte.

Pomocou zariadenia pre hmotnostnú spektrometriu MALDI-TOF MF (Matrix-assisted laser desorption-ioniza-

Obr. 5

Dôkaz produkcie metalo- β -laktamázy pomocou MBL E-testu (foto: Schréterová, 2012)



tion time-of-flight mass spectrometry) sa detekuje meropeném a produkty jeho hydrolýzy vplyvom testovaných baktérií. Výsledky sú dostupné do niekoľkých hodín. Citlivosť tejto metódy je 96,67 %, špecifickosť je 97,87 % [6]. Ďalšou metódou je stanovenie hydrolýzy imipenému pomocou UV spektrofotometrie. Citlivosť testu je 100%, špecifickosť sa blíži k 99 % [19].

Citlivosť a špecifickosť porovnateľnú s molekulárnymi testami má Carba-NP test, v ktorom sa stanovuje karbapenemázová aktivita testovaných baktérií zmenou pH. Pri hydrolýze substrátu (imipenému) dochádza k zmene pH, čo sa prejaví zmenou farby indikátora. Výsledok Carba-NP testu je k dispozícii do 2 hodín [7], pričom v modifikácii Carba NP II umožňuje test určiť aj základný typ karbapenemázy [20]. Výhodou tohto testu je nízka cena a nezávislosť od prístrojového vybavenia laboratória.

Detekcia karbapenemáz pomocou molekulárných testov poskytuje spoľahlivé výsledky, a zohráva kľúčovú úlohu najmä pri určovaní OXA-48. Je nevyhnutná pre epidemiologické štúdie a podrobnejšiu charakteristiku zachytených karbapenemáz. Nevýhodou molekulárných metód je však to, že umožňujú konfirmovať len už známe enzýmy.

Hygienicko-epidemiologické opatrenia, ktoré boli prijaté po izolácii *Klebsiella pneumoniae* rezistentnej proti karbapenému, sa týkali predovšetkým izolácie pacientov a dodržiavania prísneho hygienického režimu. Ďalším krokom bolo zisťovanie kolonizácie izolovaných pacientov a pacientov, ktorí s nimi prišli do kontaktu.

Po prvej izolácii *Klebsiella pneumoniae* s produkciou karbapenemáz, sme skrýning pacientov s možnou kolonizáciou rozšírili pridaním selektívneho média CRE Brilliance (Thermo Fisher Scientific, UK), pomocou ktorého sme zachytili *Klebsiella pneumoniae* produkujúce NDM-1 z inguíny a rekta u pacientov č. 1 a 3 (tabuľka 2). Všetky izolované klebsiely s produkciou NDM-1 boli klinicky hodnotené ako kolonizujúce. U žiadneho z pacientov nebola zaznamenaná infekcia krvného obehu spôsobená *Klebsiella pneumoniae*, produkujúcou NDM-1.

U ďalších pacientov, ktorí sa napriek protiepidemickým opatreniam dostali do kontaktu s izolovanými pacientmi, sme kolonizáciu rezistentnými klebsielami nepotvrdili.

Izoláciu kolonizovaných pacientov a prijatím zvýšených hygienicko-epidemiologických opatrení sa zabránilo rozší-

reniu multirezistentného kmeňa v našom zariadení. Ku dnešnému dňu sme ďalší výskyt enterobaktérií s produkciou NDM-1 nezaznamenali.

Literatúra

- Grundmann H, Livermore DM, et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 2010;15(46):1–13.
- Sisto A, D Ancona F, et al. Carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* from Micronet network hospitals, Italy, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2012; 17(33):1–7.
- Ambler R. The structure of beta-lactamases. *Phil Trans R Soc Lond Biol.* 1980; 289(1036):321–331.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440–458.
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 1.0 July 2013. Available from: http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/.
- Hrabák J, Walková R, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3222–3227.
- Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. 2012;18(9):1503–1507.
- CLSI 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19th informational supplement.
- Franklin C, Liolios L, et al. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(9):3139–3144.
- Giske C, Gezelius L, et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-β-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(4):552–556.
- Yong D, Lee K, et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2012;40(10):3798–3801.
- Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the Modified Hodge Test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(2): 477–479.
- Donggeun Y, Toleman MA, et al. Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046–5054.
- Kasse M, Nordmann P, et al. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(6):1260–1262.
- Nordmann P, Boulanger AE, et al. NDM-4 metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):2184–2186.
- Hornsey M, Phee L, et al. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(12):5952–5954.
- Kmeť V, Nikš M, Ohlasová D. *Klebsiella pneumoniae* NDM. GenBank KF282709. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Doyle D, Peirano G, et al. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3877–3880.
- Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74:88–90.
- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(12):6437–6440.

Doporučení antimykotické profylaxe, diagnostiky a léčby v dětské hemato-onkologii – přehled literatury a doporučení odborníků s podporou PSDH

P. SEDLÁČEK¹, P. MÚDRY², J. HORÁKOVÁ³, P. KESLOVÁ¹, L. ŠRÁMKOVÁ¹, V. CHRENKOVÁ⁴,
P. HUBÁČEK^{1,4}, J. ŠTĚRBA², PSDH: Pracovní skupina pro dětskou hematologii
při České pediatrické a České hematologické společnosti

¹Klinika dětské hematologie a onkologie, FN Motol, 2. LF UK, Praha, ²Klinika dětské onkologie, FN a LF MU, Brno,

³Klinika dětské hematologie a onkologie, LF UK a DFNSP, Bratislava, ⁴Ústav lékařské mikrobiologie, FN Motol, 2. LF UK, Praha

SOUHRN

Sedláček P., Múdry P., Horáková J., Keslová P., Šrámková L., Chrenková V., Hubáček P., Štěrba J.: **Doporučení antimykotické profylaxe, diagnostiky a léčby v dětské hemato-onkologii – přehled literatury a doporučení odborníků s podporou PSDH**

Invasivní mykotická onemocnění (IFD) jsou závažnou komplikací léčby pacientů s maligním onemocněním krvetvorby intenzivní chemoterapií a/nebo alogenní transplantací kmenových buněk krvetvorby. Navzdory spektru účinných antimykotik jsou IFD u takto imunokompromitovaných pacientů nadále příčinou vysoké morbidity a mortality. Mezi důležité rizikové faktory pro vznik IFD u těchto pacientů patří prolongovaná a těžká neutropenie, lymfopenie, dlouhodobé či opakované cykly kortikoterapie, postižení slizniční bariéry, narušení střevního mikrobiomu apod. Prognosticky nepříznivým faktorem je též skutečnost, že není vždy jednoduché stanovit včas a přesně diagnózu IFD a jednoznačně identifikovat etiologické agens. Omezená spolupráce malých dětí a klinický stav limitují včasné provedení zobrazovacích vyšetření či bronchoalveolární laváže (výkony v celkové anestezii...). Z výše uvedených důvodů vyplývá vhodnost profylaxe mykotických invazivních onemocnění u dětí ve vysokém riziku rozvoje IFD, a to navzdory její ekonomické náročnosti a riziku selhání. V našem sdělení bychom chtěli shrnout současná doporučení v primární antimykotické profylaxi a antimykotické léčbě v dětské hemato-onkologii na základě doporučení publikovaných během posledních let a vlastních zkušeností.

Klíčová slova: prevence, terapie, antimykotika, rizikové faktory, invazivní mykotické onemocnění, děti, omezení

SUMMARY

Sedláček P., Múdry P., Horáková J., Keslová P., Šrámková L., Chrenková V., Hubáček P., Štěrba J.: **Guidelines for antifungal prophylaxis, diagnosis and therapy in pediatric hematology and oncology – a review of literature and expert recommendations**

Invasive fungal disease (IFD) is a serious complication emerging during intensive chemotherapy of hematological malignancies and/or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Despite a range of effective antifungal agents, IFD in immunocompromised patients continues to cause high morbidity and mortality. Important risk factors for IFD in these patients include prolonged and severe neutropenia, lymphopenia, prolonged or repeated cycles of steroid treatment, disrupted mucosal barrier, disruption of the intestinal microbiome, etc. Another unfavorable prognostic factor is the fact that timely and accurate diagnosis of IFD and clear identification of the etiologic agent are often difficult. Limited cooperation of small children and the clinical condition are among limiting factors for early use of imaging studies or bronchoalveolar lavage (procedures under general anesthesia, etc.). For the above reasons, efficient antifungal prophylaxis is desirable in children at a high risk for the development of IFD, despite its costliness and possible failure. The paper aims to summarize current recommendations in primary antifungal prophylaxis and antifungal therapy in pediatric hematology and oncology based on recommendations published in recent years and our own experience.

Keywords: prophylaxis, therapy, antifungals, risk factors, invasive fungal infection, children, limits

Klin mikrobiol inf lék 2014;20(3):85–91

Adresa: prof. MUDr. Petr Sedláček, CSc., Klinika dětské hematologie a onkologie, FN Motol a 2. LF Univerzity Karlovy v Praze, V Úvalu 84, 150 06, Praha 5, e-mail: petr.sedlacek@fnmotol.cz

Došlo do redakce: 8. 8. 2014

Přijato k tisku: 19. 9. 2014

Úvod

Invazivní mykotická onemocnění (IFD) jsou závažnou komplikací léčby pacientů s maligním onemocněním krvetvorby intenzivní chemoterapií a/nebo alogenní transplantací kmenových buněk krvetvorby (HSCT) [1,2]. Navzdory spektru účinných antimykotik jsou IFD u takto imunokompromitovaných pacientů nadále příčinou vysoké morbidity a mortality.

Incidence mykotických infekcí v dětské hemato-onkologii se v různých centrech liší podle spektra pacientů, zkušenosti centra a dostupnosti diagnostických možností, epidemiologické situace a používané antimykotické profylaxe. V retrospektivních publikacích z posledních let se incidence pravděpodobné či prokázané IFD u dětských pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) pohybuje v rozmezí 10–15 %, u vysoce rizikové formy akutní lymfoblastické leukémie (ALL) či při relapsu ALL činí 6–21 %, u alogenní HSCT (transplantace kmenových buněk krvetvorby) 4–15 %. Tato incidence ospravedlňuje primární profylaxi proti kvasinkám (především ALL) i vláknitým houbám (především AML a HSCT). Mortalita u pacientů s AML či po HSCT se pohybuje v rozmezí 20–50 % s vyšší mortalitou u infekcí způsobených vláknitými houbami (> 70 %) a u pacientů po alogenní HSCT [3].

Při rozhodování o profylaxi, diagnostice a léčbě mykóz může být automatické přebírání dat publikovaných na sestavách dospělých pacientů zavádějící a nevhodné, pokud budeme závěry a doporučení nekriticky přejímat i pro dětské pacienty. Zásadně se rizikové faktory pro rozvoj IFD u dětí samozřejmě neliší od dospělých pacientů. V oblasti hemato-onkologie dominují i u dětí prolongovaná neutropenie, kortikoterapie, T lymfopenie, mukozitida, používání centrálního žilního katétru. K rizikovým faktorům infekcí způ-

sobených vláknitými houbami (aspergily, mukor) patří přetížení organismu železem po opakovaných transfuzích (iron overload). U polytransfundovaných jedinců je proto důležité monitorovat feritin a včas a indikovaně se rozhodnout o vhodné chelatační léčbě (deferipron, deferasirox). Léčebné režimy a intenzita léčby akutních leukémií se však liší mezi protokoly používanými a určenými především pro děti nebo pro dospělé. To může mít významný dopad na riziko a závažnost komplikací. Při srovnání léčby dospívajících léčených dle dospělých nebo pediatrických protokolů zjišťujeme, že protokoly používané v léčbě dětských pacientů s ALL doporučují vyšší dávky kortikoidů a asparaginázy. Zvýšená intenzita léčby vede k lepším výsledkům přežití, ale zároveň je spojena s vyšší toxicitou. Regenerace T-buněk po intenzivní chemoterapii, jak do počtu, tak i repertoáru T-buněk, kriticky závisí na věku pacienta. Tyto rozdíly se mohou spolupodílet na odlišné epidemiologii invazivních mykotických infekcí u dětí a dospělých. Také incidence a charakter komorbidit se liší mezi dětmi a dospělými pacienty, což mj. souvisí s rozdíly ve výživě a životním stylu.

Malé děti nejsou schopny polykat nedrcené tablety nebo kapsle, a tak je nutno zvážit odlišnou dostupnost perorální lékové formy. Těž úroveň spolupráce (compliance/adherence) se u dětí liší. Potenciálně lepší bývá u malých dětí, kde mohou rodiče lépe sledovat podávání léčby. Nejhorší spolupráce bývá u dětí v období dospívání [4].

Především u dětí ve věkovém rozmezí 0–8 let musíme zohlednit rozdílné dávkování léků v závislosti na hmotnosti, odlišné farmakokinetice a na bezpečnostním spektru léků. Situaci komplikuje nedostatek farmakologických studií (efektivita, bezpečnost) především u malých dětí. Použití některých antimykotik často stojí mimo oficiálně schválená doporučení a indikace [5]. Volba správné dávky antimykotika u dětí v závislosti na věku a hmotnosti dítěte proto není při absenci dat snadná [6,7].

U konkrétních pacientů se samozřejmě vždy zamýšlíme nad volbou vhodného antimykotika též v souvislosti s lékovou formou, tolerancí, možnými nežádoucími účinky (nefrotoxicita, hepatotoxicita, neurotoxicita...) či lékovými interakcemi se souběžně podávanými léky (imunopresiva, cytostatika apod.). I když je v posledních letech velmi diskutována efektivita monitorace hladin azolů (vorikonazol, posakonazol) v prevenci či léčbě mykotických infekcí u dospělých [8], v pediatrii je monitorace nadále doporučována, a to přednostně z důvodu prevence poddávování při rozdílné farmakokinetice u malých dětí (především kojenců a batolat), rizika toxických hladin při změně vstřebávání či při interakci se souběžně podávanými léky a v posouzení míry spolupráce především u pacientů dospívajících a žijících v sociálně slabších rodinách [9–12].

Tabulka 1

Úroveň rizika pro vznik invazivního mykotického onemocnění (IFD) v dětské hemato-onkologii

Úroveň rizika	Skupina pacientů
vysoké riziko (≥ 10 %)	<ul style="list-style-type: none"> akutní myeloidní leukémie recidivující akutní leukémie akutní lymfoblastická leukémie vysokého rizika myelodysplastický syndrom s neutropenií alogenní transplantace kmenových buněk krvetvorby aplastická anémie s neutropenií > 7 (resp. > 10) dní
střední riziko (5–10 %)	<ul style="list-style-type: none"> akutní lymfoblastická leukémie středního a nízkého rizika* lymfom ne-Hodgkinova typu > CR1
nízké riziko (≤ 5 %)	<ul style="list-style-type: none"> lymfom ne-Hodgkinova typu autologní transplantace kmenových buněk krvetvorby
sporadický výskyt	<ul style="list-style-type: none"> solidní nádory dětského věku nádory CNS Hodgkinův lymfom

* Poznámka: V závislosti na léčebném protokolu a dalších rizikových faktorech může riziko IFD přesáhnout 10 %.

Primární antimykotická profylaxe

Primární antimykotická profylaxe zahrnuje prevenci expozice z ovzduší a životního prostředí (roušky, vzduchové filtry...), ze stravy (nizkomi-krobní strava) a prevenci vzniku infekce s použitím farmakologické antimykotické profylaxe [13,14]. Cílem je zabránit vzniku IFD u dětí, a tím zlepšit jejich šanci na přežití. Antimykotická profylaxe je indikována u pacientů s rizikem výskytu IFD 10 % a více. To v oblasti dětské hematologie a onkologie zahrnuje pacienty s AML [15], pokročilou formou myelodysplastického syndromu (MDS) a/nebo formy spojené s déletrvající neutropenií (nad 7 dní), s ALL vysokého rizika či v relapsu a v neposlední řadě pacienty, kteří podstupují alogenní HSCT [5,16,17] (tabulka 1). Kromě toho v závislosti na volbě léčebného protokolu může řada pacientů s ALL nízkého či středního rizika či lymfomu ne-Hodgkinova typu (NHL) mimo první remisi profitovat z profylaxe proti invazivním kvasinkovým infekcím [18]. Incidence infekcí vláknitými houbami je u těchto pacientů nižší [19] (tabulka 2).

Správně indikovaná antimykotická profylaxe snižuje riziko IFD, ale nezabrání vzniku průlomové mykotické infekce kmeny rezistentními na podávaná antimykotika. U pacientů mimo antimykotickou profylaxi musíme na riziko IFD myslet a na základě klinického podezření a pečlivého laboratorního vyšetření včas indikovat empirickou, preemptivní či cílenou antimykotickou léčbu.

Především v průběhu posledních dvou desetiletí různé odborné lékařské společnosti stanovují řadu doporučení na téma farmakologické antimykotické profylaxe na základě retrospektivních i prospektivních studií s použitím různých orálně, inhalačně i parenterálně podávaných antimykotik. Byla publikována i řada doporučení založených na důkazech pro dospělé s maligním onemocněním a/nebo v rámci transplantace hematopoetických kmenových buněk [20,21]. V pediatrii je však takových obecně přijatých doporučení minimum [5,22].

Intenzivní chemoterapie akutní myeloidní leukémie/myelodysplastického syndromu

Tak jako u dospělých pacientů, i u dětí je v období neutropenie v průběhu léčby AML či MDS na základě publikovaných dat doporučováno podávání posakonazolu či vorikonazolu v prevenci invazivních mykotických infekcí způsobených kvasinkami či vláknitými houbami [11,15, 23–25]. Preventivní podávání vorikonazolu u dětí v průběhu intenzivní chemoterapie AML vedlo ke snížení incidence invazivní aspergilózy, ale zvýšeně jsou diagnostikovány průlomové invazivní mykotické infekce způsobené jinými vláknitými houbami, které jsou na vorikonazol rezistentní [23].

Tabulka 2

Primární antimykotická profylaxe v dětské hemato-onkologii

Diagnóza	Období	Preparát
AML, MDS	neutropenie a/nebo mezi bloky chemoterapie	posakonazol vorikonazol
ALL, NHL	neutropenie a/nebo léčba kortikoidy a/nebo mezi bloky chemoterapie (HR, relaps)	flukonazol
alogenní SCT	neutropenie do přihojení	echinokandiny
alogenní SCT	aktivní akutní/chronická GvHD a/nebo léčba kortikoidy a/nebo léčba biologickými preparáty, MoAb a/nebo dlouho trvající lymfopenie	posakonazol vorikonazol

Zkratky: AML – akutní myeloidní leukémie, MDS – myelodysplastický syndrom, ALL – akutní lymfoblastická leukémie, NHL – lymfom ne-Hodgkinova typu, SCT – transplantace kmenových buněk, HR – vysoké riziko, GvHD – reakce štetu proti hostiteli, MoAb – monoklonální protilátky

Z dostupných publikovaných dat vyplývá nezbytnost specifického dávkování vorikonazolu u dětí, protože ve srovnání s dospělými potřebují děti vyšší dávky [10,26]. Vorikonazol však může být alternativou při problémech s tolerancí lékové formy posakonazolu. V Evropě je posakonazol nadále schválen pouze pro pacienty ve věku ≥ 18 let.

Lék je v současné době k dispozici pouze ve formě perorální suspenze, ale jeho tabletová forma by i v ČR měla být dostupná do konce roku 2014. Tabletová forma bude mít jiné dávkování. Zatím nebyla farmakokinetika posakonazolu (suspenze i tablet) u dětí zkoumána systematicky [9]. K dispozici jsou pouze omezené farmakokinetické údaje, které neindikují žádné zásadní rozdíly v průměrných plazmatických koncentracích u dětí ve věku ≥ 8 let ve srovnání s dospělými v doporučených dávkách [12]. Podle našich vlastních zkušeností podávání posakonazolu u dětí s AML nebo MDS v průběhu aplázie s krátkým přerušením po dobu podávání cytostatik významně snížilo riziko manifestace IFD. Protože neznáme účinnou dávku pro preventivní podání posakonazolu u dětí do 12 let, používáme v profylaxi stejné dávkování jako v léčbě. U dětí ve věku od 13 let je preventivní dávkování posakonazolu doporučeno ve stejné dávce jako u dospělých [9].

Alogenní transplantace kmenových buněk krvetvorby

U dospělých i dětských pacientů v období neutropenie a intenzivní potransplantační imunosuprese po alogenní HSCT je doporučována primární prevence IFD podáváním echinokandinů či triazolů druhé generace [27–29]. Profylaxe s použitím flukonazolu vedla k poklesu incidence kvasinkových infekcí, ale ne vždy mortality, v době před používáním alternativních dárců a štetů [30]. V současné době u jiného spektra příjemců i dárců již není dostatečně efektivní, protože není účinná v prevenci IFD způsobených

vláknitými houbami nebo flukonazol-rezistentními kvasinami [31]. V časně fázi po transplantaci jsou rizika podobná jako u pacientů v léčbě AML intenzivní chemoterapií (období aplázie, mukozitida, širokospektrá antibiotika). Specifikem pro transplantované pacienty je až fáze po přihojení granulocytů při trvající imunopresi v prevenci, ale především v léčbě akutní nebo chronické reakce štetu proti hostiteli (GvHD). V takovém období, trvajícím u některých pacientů řadu měsíců i let, dominuje především těžká lymfopenie. Způsob antimykotické profylaxe se proto liší v závislosti na období po transplantaci (časná neutropenie, pozdní lymfopenie), podle druhu použitého dárce (identický sourozenec, haploidentický dárce, pupečnicková krev...), aktivity a léčby GvHD [27,32].

Pro časnou fázi před přihojením s ohledem na lepší toleranci a nízké riziko lékových interakcí a toxicit používáme u dětí denní podávání echinokandinů (casposungin, micafungin) [29,33,34]. Po přihojení a převedení na perorální medikaci echinokandiny vysazujeme a u dětí, které nejsou léčeny pro akutní či chronickou GvHD a/nebo nedostávají systémově kortikoidy, už další primární antimykotickou prevenci neprovádíme. V případě podávání systémových kortikoidů a/nebo biologické léčby v průběhu léčby akutní či chronické GvHD přecházíme dle tolerance na preventivní podávání posakonazolu, resp. vorikonazolu [22,35]. Z důvodu prevence toxicity, posouzení spolupráce a zajištění účinnosti monitorujeme jejich hladiny.

U dětí s vrozenou poruchou imunity (těžký kombinovaný imunodeficit, chronická granulomatóza...) i u dětí s maligním onemocněním krvetvorby používáme v průběhu transplantace a následné imunoprese cílenou sekundární profylaxi v případě, že se v anamnéze vyskytuje údaj o pravděpodobné či prokázané IFD.

Intenzivní chemoterapie akutní lymfoblastické leukémie

Primární antimykotická prevence je indikována u pacientů v průběhu intenzivní léčby vysoce rizikové formy a relapsu ALL. Přístup k primární farmakologické antimykotické profylaxi u dětí v intenzivní léčbě ALL nízkého a středního rizika je nadále nejednotný. Většinou pro tuto kategorii pacientů ve středním a nízkém riziku manifestace IFD (incidence pod 10 %) primární antifungální profylaxe není doporučována. Incidenci IFD však může významně ovlivnit volba léčebného protokolu a další rizikové faktory. V posledních letech jsme u dětí s ALL, léčených dle současných protokolů BFM skupiny, konfrontováni s trendem nárůstu incidence invazivních kvasinkových infekcí, a to především v období kortikoterapie, déletrvajících neutropenií a u dětí s enterokolitidou infekční i toxické etiologie. Při absenci profylaxe přesáhla incidence invazivních kandidóz hranici 10 % pacientů s ALL v primární léčbě. Mezi nejčastější izoláty kvasinek u dětí v hemato-onkologii patří *C. albicans*, *C. parapsilosis* a *C. tropicalis*. Výskyt kvasinek primárně rezistentních na flukonazol zatím není vysoký. Incidence IFD způsobených vláknitými houbami je v této skupině nižší, profylaktické podávání antimykotik s účinkem proti vláknitým houbám tedy není indikované [19]. U dětí s ALL se proto přikláníme k profylaktickému podá-

vání flukonazolu v průběhu kortikoterapie a/nebo déletrvajících neutropenií nad 7 dní, resp. v období mezi bloky vysokodávkované chemoterapie (vysoce rizikové formy ALL, relapsy, kojenecké leukémie) [16]. Flukonazol je dobře tolerován, výskyt toxických účinků je nízký (kolem 3 %). Ve srovnání s dospělými mají děti i adolescenti vyšší clearance flukonazolu, a proto vyžadují vyšší dávkování k zajištění účinných hladin. Spektrum účinku nezahrnuje vláknité houby, použití flukonazolu proto nezkrusuje výpovědní hodnotu diagnostických laboratorních metod [36]. Proto u pacientů s ALL v době febrilní neutropenie preferujeme strategii preemptivní antifungální léčby.

Použití jiných azolů v průběhu intenzivní chemoterapie ALL sebou přináší především rizika závažných interakcí s vinkristinem (neurotoxicita, syndrom SIADH, gastrointestinální toxicita, křeče) [37]. Podávání parenterálních antimykotik v profylaxi je finančně, ale i organizačně zatěžující, protože významná část intenzivní léčby dětí s ALL, především nízkého či středního rizika, probíhá ambulantním způsobem. Efektivita profylaktického podávání parenterálních antimykotik (preparáty amfotericinu B, echinokandiny) 2–3 dny v týdnu nebyla jednoznačně prokázána. Jejich podávání však může negativně ovlivňovat výpovědní hodnotu sérologické a PCR diagnostiky invazivní aspergilózy.

Febrilní neutropenie v dětské hemato/onkologii

Musíme si být vědomi, že u dětských hemato-onkologických pacientů na antimykotické profylaxi (viz výše), ale i u těch, kteří nejsou k primární antimykotické profylaxi indikováni (autologní transplantace, intenzivní chemoterapie solidních tumorů, imunopresivní léčba aplastické anémie...), může dojít k invazivní mykotické infekci. Riziko infekce je vyšší u pacientů v déletrvajících neutropeniích (nad 7 dní), s mukozitidou, enterokolitidou, u pacientů vystavených prašnému či jinak rizikovému prostředí, u nedostatečně spolupracujících pacientů aj. Proto u těchto pacientů při trvající febrilní neutropenii (nad 96 hod) či při recidivě teplot a/nebo trvající aktivitě zánětlivých parametrů cíleně pátáme po klinických, zobrazovacích i laboratorních známkách mykotické infekce a volíme přístup preemptivně indikované antifungální léčby. Při volbě vhodného preparátu a při interpretaci laboratorních nálezů musíme zohlednit případný vliv předchozího (profylaktického) podávání azolů.

Alternativy antimykotické profylaxe

Mezi další alternativní postupy cílené ke snížení rizika rozvoje IFD u pacientů s hematologickou malignitou můžeme řadit používání inhalací preparátů amfotericinu B v prevenci mykotické sinusitidy či bronchopneumonie, antimykotických zámek v prevenci tvorby biofilmu a kvasinkové infekce centrálního žilního katétru, podávání nevstřebatelných antimykotik s cílem selektivní dekontaminace trávicího traktu apod. Další metodou je rutinní pravidelné sledování kolonizace asymptomatických pacientů s cílem ovlivnit na základě výsledků volbu antimykotika při podezření na možnou IFD [38]. Jednoznačný průkaz efektivity těchto postupů však nemáme.

Sekundární antimykotická profylaxe

Sekundární antimykotickou profylaxi definujeme jako cílenou farmakologickou prevenci reaktivace dříve prodělané invazivní mykotické infekce. Anamnéza IFD je spojena se signifikantním rizikem reaktivace u pacientů s hematologickou malignitou, kteří vstupují do fáze léčby s výraznou poruchou imunitního systému v důsledku pokračování primární intenzivní chemoterapie nebo při jejím zahájení pro relaps onemocnění či jsou indikováni k alogenní transplantaci kmenových buněk krvetvorby. Sekundární antimykotická profylaxe riziko reaktivace významně snižuje a její indikaci můžeme v takové situaci považovat za mandatorní. Pokud známe patogena, který byl původcem prodělané IFD, a máme laboratorně či alespoň klinicky ověřenou jeho dobrou citlivost na vybraná antimykotika, měli bychom toto respektovat při volbě preparátu. Volba vhodného preparátu bývá někdy limitována dostupnou lékovou formou, rizikem interakcí se souběžně podávanými léky aj. Navzdory sekundární profylaxi může u pacienta dojít k reaktivaci či k průlomové mykotické infekci. Doba podávání sekundární profylaxe by měla pokrývat celé období významné imunosuprese a pokračující intenzivní chemoterapie (opakované či prolongované neutropenie, těžké T lymfopenie při prevenci či léčbě potransplantační reakce štěpu proti hostiteli) [39, 40,41].

Specifika diagnostiky a léčby IFD u dětí

Empirická antimykotická léčba u pacientů ve febrilní neutropenii je zahajována obvykle po 96 hodinách trvání teplot při širokospektré léčbě antibiotiky a nejasném původci infekce nebo při recidivě teplot. Je indikována především u pacientů ve vyšším riziku IFD. U pacientů v nižším riziku

u rozvoje IFD je indikací k empirické antimykotické léčbě těžká a protrahovaná neutropenie a/nebo významné postižení sliznic. V každém případě by nasazení antimykotik v empirické léčbě mělo být současně provázeno snahou potvrdit či vyvrátit mykotickou etiologii [42]. Empirická léčba by měla pokračovat do doby odeznění neutropenie při absenci jiných známek možné či prokázané mykotické infekce. U pacientů na antimykotické profylaxi bychom o případné změně či rozšíření antimykotické léčby měli rozhodovat též na základě výsledků cílené mykotické diagnostiky.

V centrech, ve kterých je kdykoliv dostupné široké spektrum diagnostických postupů, preferujeme u pacientů v riziku IFD strategii preemptivní léčby. K volbě vhodného antimykotika přistupujeme nejen s ohledem na primární diagnózu, podanou léčbu, klinický stav a stav imunitního systému, ale současně se snažíme plně využít všech rychle a široce dostupných diagnostických metod s cílem mykotickou infekci potvrdit či vyvrátit. Tyto metody zahrnují zobrazovací vyšetření (především CT a ultrazvuk), stanovení mykotických antigenů (galaktomannan, mannan, beta-D-glukan) a možnost včasného provedení bronchoalveolární laváže s odběrem materiálu k mikrobiologickému vyšetření (BAL) [43]. K rozšířeným metodám zatím patří panfungální či specifická PCR diagnostika z krve či ze vzorků napadené tkáně [44,45]. Na základě výsledků pak cíleně upravujeme antimykotickou léčbu. Diagnostický panel není vždy snadné z různých důvodů u dětí plně aplikovat. U menších dětí je nutno některá vyšetření provádět v celkové anestézii (CT, NMR, BAL). Interpretace CT nálezů například u plicní aspergilózy dětí nebývá identická ve srovnání s dospělými [46]. Záchyt mykotických antigenů u dětí se pravděpodobně mírně liší, ale pro nedostatek publikovaných dat toto nelze jednoznačně prokázat [36,47] (tabulka 3).

Tabulka 3
Preemptivní diagnostika invazivní mykotické infekce v pediatrii

Metoda	Materiál/lokalita	Pediatrický komentář
galaktomannan	sérum, BAL, mozkomíšni mok, diagnostický punktát	optimální hodnota pozitivivity není u dětí jednoznačně definována v žádném materiálu
mannan	sérum	nemá prediktivní hodnotu není u dětí validováno
beta-D-glukan	sérum	limitovaná data u dětí optimální hodnota pozitivivity není u dětí jednoznačně definována
PCR (detekce DNA)	krev, diagnostický punktát, biopsie tkáně	chybí standardizace a validace u dětí se neliší od dospělých
mikroskopie/kultivace	krev, BAL, mozkomíšni mok, punktát či biopsie tkáně	u dětí se neliší od dospělých
CT	plíce, VDN, CNS	plicní nálezy u IA u dětí především < 5 let jsou necharakteristické
USG	parenchymatózní orgány (slezina, játra, ledviny...)	u dětí se neliší od dospělých, změny na orgánech u IC se zviditelňují se zpožděním při regeneraci neutrofilů

Zkratky: BAL – bronchoalveolární laváž, CT – počítačová tomografie, VDN – vedlejší nosní dutiny, PCR – polymerázová řetězová reakce, USG – ultrasonografie, CNS – centrální nervový systém, IA – invazivní aspergilóza, IC – invazivní kandidóza

Dosud publikovaná sdělení i nepublikované zkušenosti neindikují rozdílné výsledky v empirické či preemptivní léčbě mezi dětmi a dospělými [48], a proto i u dětí s vysokým rizikem rozvoje IFD považujeme lipidové formy amfotericinu B nebo echinokandiny za vhodnou volbu v této indikaci [42,43,49]. Při volbě antimykotika samozřejmě musíme zohlednit dosavadní antimykotickou profylaxi. Na základě dostupných údajů ale zatím nelze pro děti stanovit jasná doporučení. Při preemptivním přístupu léčby musíme pečlivě hodnotit riziko falešné negativity mikrobiologických metod (sérologie, PCR, kultivace) v důsledku účinku profylakticky podávaných antimykotik.

Cílenou antimykotickou léčbu dokumentované IFD nelze detailněji komentovat, protože v dětské hematologii a onkologii nejsou publikované dostatečně průkazné studie, a tak se často spoléháme na data získaná na souborech dospělých pacientů, na vlastní zkušenosti a jednotlivé kazuistiky [50]. Nepředpokládáme zásadní odlišnost v účinnosti antimykotik u dětí v cílené antimykotické léčbě. Situaci v pediatrii, a to především u dětí mladších, ale komplikuje u některých antimykotik nedostatek farmakokinetických a bezpečnostních dat. K rizikům, která z toho vyplývají, patří možné odlišné spektrum toxických projevů, snížená účinnost v důsledku poddávkování či vyšší toxicita při předávkování na základě nekritického přenesení dávkovacích schémat stanovených u dospělých pacientů [26]. Další komplikací může být skutečnost, že vhodný lék není regulačními orgány schválen pro použití u dětí [51].

Diskuze

Lze konstatovat, že ani po desítkách let nebylo zatím dosaženo širokého konsenzu o indikaci a efektivitě profylaxe IFD u dětí s maligním onemocněním krvetvorby v průběhu intenzivní chemoterapie a/nebo podstupujících alogenní transplantaci kmenových buněk krvetvorby. Na jedné straně řada pracovišť s menšími lokálními úpravami svoje postupy v prevenci IFD odvozuje od doporučení odborných společností pro dospělé pacienty, jiná centra dávají přednost strategii včasné empirické, preemptivní či cílené antimykotické léčby [52,53]. Kombinace obou rozdílných postupů je zatížena skutečností, že preventivní podávání antimykotik významně snižuje citlivost, a tím i výpovědní hodnotu neinvazivních diagnostických metod (sérologická detekce antigenů, PCR). Problémem u dětí je ze stejného důvodu i interpretace laboratorních výsledků vyšetření, pokud vyšetření proběhla (například z organizačních důvodů) až po empirickém nasazení antimykotik.

Přestože v současné době disponujeme širším spektrem relativně bezpečných antimykotik se systémovým účinkem, není role široce aplikované farmakologické antimykotické profylaxe u dětí s hematologickým či onkologickým onemocněním jednoznačně pozitivní. Naopak dlouhodobé podávání antimykotik v profylaxi může vést k selekci primárně či sekundárně rezistentních mykotických kmenů [54]. U konkrétních pacientů se též musíme zamyslet při volbě vhodného antimykotika nad riziky nežádoucích účinků (nefrototoxicita, hepatotoxicita, neurotoxicita...), lékovými interakcemi se souběžně podávanými imunosupresivy či cytostatiky, lokálním průnikem apod. [55,56].

Závěr

V roce 2012 byla vydána doporučení ECIL 4 (na základě závěrů 4. Evropské konference o infekcích u pacientů s leukémií) pro prevenci a léčbu mykotických infekcí v dětské hemato-onkologii. V roce 2014 byla tato doporučení publikována v časopise *Lancet Oncology* [57].

Podpořeno projektem MZ ČR – RVO, FN Motole 00064203.

Literatura

- Castagnola E, et al. Role of management strategies in reducing mortality from invasive fungal disease in children with cancer or receiving hemopoietic stem cell transplant: a single center 30-year experience. *The Pediatric infectious disease journal*. 2014;33(3):233–237.
- Mor M, et al. Invasive fungal infections in pediatric oncology. *Pediatric blood & cancer*. 2011;56(7):1092–1097.
- Kobayashi R, et al. The clinical feature of invasive fungal infection in pediatric patients with hematologic and malignant diseases: a 10-year analysis at a single institution in Japan. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2008;30(12):886–890.
- Mancini J, et al. Adherence to leukemia maintenance therapy: a comparative study among children, adolescents, and adults. *Pediatric hematology and oncology*. 2012;29(5):428–439.
- Tragiannidis A, et al. Antifungal chemoprophylaxis in children and adolescents with haematological malignancies and following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: review of the literature and options for clinical practice. *Drugs*. 2012;72(5):685–704.
- Hope WW, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by Candida spp. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2012;18 Suppl 7:38–52.
- Groll AH, et al. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation. *The lancet oncology*. 2014;15(8):327–340.
- Groll AH, Lumb J. New developments in invasive fungal disease. *Future microbiology*. 2012;7(2):179–184.
- Bernardo VA, et al. Posaconazole therapeutic drug monitoring in pediatric patients and young adults with cancer. *The Annals of pharmacotherapy*. 2013;47(7–8):976–983.
- Pieper S, et al. Monitoring of voriconazole plasma concentrations in immunocompromised paediatric patients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(11):2717–2724.
- Yunus S, et al. Azole-based chemoprophylaxis of invasive fungal infections in paediatric patients with acute leukaemia: an internal audit. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(3):815–820.
- Krishna G, et al. Posaconazole plasma concentrations in juvenile patients with invasive fungal infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(3):812–818.
- Thom KA, Kleinberg M, Roghmann MC. Infection prevention in the cancer center. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;57(4):579–585.
- Ariza-Heredia E, Kontoyiannis DP. Our recommendations for avoiding exposure to fungi outside the hospital for patients with haematological cancers. *Mycoses*. 2014; 57(6):336–341.
- Fisher BT, et al. Antifungal prophylaxis associated with decreased induction mortality rates and resources utilized in children with new-onset acute myeloid leukemia. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;58(4):502–508.
- Yeh TC, et al. Severe infections in children with acute leukemia undergoing intensive chemotherapy can successfully be prevented by ciprofloxacin, voriconazole, or micafungin prophylaxis. *Cancer*. 2014;120(8):1255–1262.
- Mandhaniya S, et al. Oral voriconazole versus intravenous low dose amphotericin B for primary antifungal prophylaxis in pediatric acute leukemia induction: a prospective, randomized, clinical study. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2011;33(8):e333–341.
- Steinbach WJ, et al. Results from a prospective, international, epidemiologic study of invasive candidiasis in children and neonates. *The Pediatric infectious disease journal*. 2012;31(12):1252–1257.
- Kaya Z, et al. Invasive fungal infections in pediatric leukemia patients receiving fluconazole prophylaxis. *Pediatric blood & cancer*. 2009;52(4):470–475.
- Castagna L, et al. ECIL 3-2009 update guidelines for antifungal management. *Bone marrow transplantation*. 2012;47(6):866.

21. Maertens J, et al. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3-2009 update. *Bone marrow transplantation*. 2011;46(5):709–718.
22. Science M, et al. Guideline for primary antifungal prophylaxis for pediatric patients with cancer or hematopoietic stem cell transplant recipients. *Pediatric blood & cancer*. 2014;61(3):393–400.
23. Maron GM, et al. Voriconazole prophylaxis in children with cancer: changing outcomes and epidemiology of fungal infections. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(12):451–455.
24. Gramatges MM, Winter SS. Recommendations for broader coverage antifungal prophylaxis in childhood acute myeloid leukemia: ASH evidence-based review. 2011 Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology. *American Society of Hematology*. Education Program. 2011;2011:374–376.
25. Freifeld AG, et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(4):56–93.
26. Shima H, et al. Differences in voriconazole trough plasma concentrations per oral dosages between children younger and older than 3 years of age. *Pediatric blood & cancer*. 2010;54(7):1050–1052.
27. Girmenia C, et al. Primary Prophylaxis of Invasive Fungal Diseases in Allogeneic Stem Cell Transplantation: Revised Recommendations from a Consensus Process by Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 2014.
28. Doring M, et al. Comparison of itraconazole, voriconazole, and posaconazole as oral antifungal prophylaxis in pediatric patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2014;33(4):629–638.
29. Doring M, et al. Caspofungin as antifungal prophylaxis in pediatric patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. *BMC infectious diseases*. 2012;12:151.
30. Ninane J. A multicentre study of fluconazole versus oral polyenes in the prevention of fungal infection in children with hematological or oncological malignancies. Multicentre Study Group. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 1994;13(4):330–337.
31. Hol JA, et al. Predictors of invasive fungal infection in pediatric allogeneic hematopoietic SCT recipients. *Bone marrow transplantation*. 2014;49(1):95–101.
32. Girmenia C, et al. Incidence and outcome of invasive fungal diseases after allogeneic stem cell transplantation: a prospective study of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014;20(6):872–880.
33. Yoshikawa K, et al. Safety, tolerability, and feasibility of antifungal prophylaxis with micafungin at 2 mg/kg daily in pediatric patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Infection*. 2014;42(4):639–647.
34. van Burik JA, et al. Micafungin versus fluconazole for prophylaxis against invasive fungal infections during neutropenia in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;39(10):1407–1416.
35. Doring M, et al. Analysis of posaconazole as oral antifungal prophylaxis in pediatric patients under 12 years of age following allogeneic stem cell transplantation. *BMC infectious diseases*. 2012;12:263.
36. Dinand V, et al. Threshold of galactomannan antigenemia positivity for early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic children. *Journal of microbiology, immunology and infection*. 2014.
37. Moriyama B, et al. Adverse interactions between antifungal azoles and vincristine: review and analysis of cases. *Mycoses*. 2012;55(4):290–297.
38. Youngster I, et al. Yield of fungal surveillance cultures in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients: a retrospective analysis and survey of current practice. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;58(3):365–371.
39. Cordonnier C, et al. Voriconazole for secondary prophylaxis of invasive fungal infections in allogeneic stem cell transplant recipients: results of the VOSIFI study. *Haematologica*. 2010;95(10):1762–1768.
40. Masamoto Y, Nannya Y, Kurokawa M. Voriconazole is effective as secondary antifungal prophylaxis in leukemia patients with prior pulmonary fungal disease: case series and review of literature. *Journal of chemotherapy*. 2011;23(1):17–23.
41. Liu F, et al. Risk factors for recurrence of invasive fungal infection during secondary antifungal prophylaxis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society*, 2013.
42. Caselli D, et al. A prospective, randomized study of empirical antifungal therapy for the treatment of chemotherapy-induced febrile neutropenia in children. *British journal of haematology*. 2012;158(2):249–255.
43. Lehnbecher T, et al. Guideline for the management of fever and neutropenia in children with cancer and/or undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(35):4427–4438.
44. Mandhaniya S, et al. Diagnosis of invasive fungal infections using real-time PCR assay in paediatric acute leukaemia induction. *Mycoses*. 2012;55(4):372–379.
45. Buitrago MJ, et al. Performance of panfungal and specific-PCR-based procedures for etiological diagnosis of invasive fungal diseases on tissue biopsy specimens with proven infection: a 7-year retrospective analysis from a reference laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(5):1737–1740.
46. Burgos A, et al. Pediatric invasive aspergillosis: a multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases. *Pediatrics*. 2008;121(5):1286–1294.
47. Castagnola E, et al. Performance of the galactomannan antigen detection test in the diagnosis of invasive aspergillosis in children with cancer or undergoing haemopoietic stem cell transplantation. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010;16(8):1197–1203.
48. Maertens JA, et al. A randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus liposomal amphotericin B for empiric antifungal therapy in pediatric patients with persistent fever and neutropenia. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010;29(5):415–420.
49. Kobayashi R, et al. Efficacy and safety of micafungin for febrile neutropenia in pediatric patients with hematological malignancies: a multicenter prospective study. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2013;35(7):e276–279.
50. Mori M. Nationwide survey of treatment for pediatric patients with invasive fungal infections in Japan. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2013;19(5):946–950.
51. Valerio C, et al. Antifungal agents in current pediatric practice. *Current infectious disease reports*. 2013;15(3):278–287.
52. Rogers TR, Slavin MA, Donnelly JP. Antifungal prophylaxis during treatment for haematological malignancies: are we there yet? *British journal of haematology*. 2011;153(6):681–697.
53. Marchetti O, et al. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone marrow transplantation*. 2012;47(6):846–854.
54. Petrikos G, Skiada A. Recent advances in antifungal chemotherapy. *International journal of antimicrobial agents*. 2007;30(2):108–117.
55. Nivoix Y, et al., Drug-drug interactions of triazole antifungal agents in multimorbid patients and implications for patient care. *Current drug metabolism*. 2009;10(4):395–409.
56. Gubbins PO. Mould-active azoles: pharmacokinetics, drug interactions in neutropenic patients. *Current opinion in infectious diseases*. 2007;20(6):579–586.
57. Groll AH, et al. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 4): guidelines for diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation. *The lancet oncology*. 2014;15(8):e327–e340.

Dysfunkce štítné žlázy při léčbě chronické hepatitidy B a C interferonem alfa – dvacetileté zkušenosti

I. ORSÁGOVÁ¹, L. ROŽNOVSKÝ¹, L. PETROUŠOVÁ¹, M. KONEČNÁ¹,
L. KABIESZOVÁ¹, K. ŠAFARČÍK², A. KLOUDOVÁ³

¹Klinika infekčního lékařství, Fakultní nemocnice Ostrava;

²Ústav laboratorní diagnostiky, Fakultní nemocnice Ostrava;

³Centrum klinických laboratoří, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

SOUHRN

Orságová I., Rožnovský L., Petroušová L., Konečná M., Kabieszová L., Šafarčík K., Kloudová A.: **Dysfunkce štítné žlázy při léčbě chronické hepatitidy B a C interferonem alfa – dvacetileté zkušenosti**

Cíl práce: Stanovit výskyt dysfunkce štítné žlázy u pacientů s chronickou hepatitidou B a C (VHB, VHC), kteří byli léčeni interferonem alfa (IFN).

Soubor pacientů a metody: Na Klinice infekčního lékařství v Ostravě byly v letech 1992–2013 hodnoceny parametry štítné žlázy u 304 pacientů (256 s VHC, 48 s VHB), kteří byli léčeni konvenčním nebo pegylovaným IFN. Před léčbou, v průběhu a po ukončení protivirové léčby byl stanovován thyreostimulační hormon (TSH), thyroxin (T₄), trijódthyronin (T₃), resp. jejich volné frakce fT₄ a fT₃, protilátky proti štítné žláze (proti thyreoglobulinu, proti mikrosomální frakci) a byla hodnocena klinická manifestace dysfunkcí štítné žlázy.

Výsledky: Změny TSH byly prokázány u 75 pacientů (25 %), z nichž 68 mělo VHC a 7 VHB. Hypotyreóza byla zjištěna u 39 pacientů (34 s VHC), z nichž 25 pacientů vyžadovalo substituční léčbu, která byla následně ukončena u 5 pacientů. Hypertyreóza s přechodnou supresivní léčbou karbimazolom se rozvinula u 4 pacientů s VHC. U 32 pacientů byly změny TSH hodnoceny jako subklinická hypotyreóza. Abnormální hodnoty T₃ byly zjištěny u 188 (62 %) a T₄ u 49 (16 %) pacientů, uvedené změny prakticky nekorelovaly se změnami TSH. Autoantitělky byly zjištěny u 54 (18 %) pacientů, u 30 z nich byly současně zaznamenány změny TSH.

Závěr: V souboru 304 pacientů léčených IFN pro chronickou hepatitidu byly zjištěny tyreopatie se změnami TSH u čtvrtiny pacientů, jednoznačně převažovala hypotyreóza. Tyreopatie se rozvinula u poloviny pacientů s přítomností autoantitělky proti štítné žláze.

Klíčová slova: chronická hepatitida C a B, léčba interferonem alfa, dysfunkce štítné žlázy, autoantitělky

SUMMARY

Orságová I., Rožnovský L., Petroušová L., Konečná M., Kabieszová L., Šafarčík K., Kloudová A.: **Thyroid dysfunction during interferon alpha therapy for chronic hepatitis B and C – twenty years of experience**

Objective: To determine the incidence of thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis B and C (HBV, HCV) who were treated with interferon (IFN) alpha.

Patients and methods: In the years 1992–2013, parameters of the thyroid gland were evaluated in 304 patients (256 with HCV, 48 with HBV) who were treated with conventional or pegylated IFN at the Department of Infectious Diseases in Ostrava. Prior to, during and after completion of antiviral treatment, levels of thyroid stimulating hormone (TSH), thyroxine (T₄), triiodothyronine (T₃), including their free fractions fT₄ and fT₃, and anti-thyroid antibodies (anti-thyroglobulin, anti-microsomal fraction) were determined and clinical manifestations of thyroid dysfunction were evaluated.

Results: TSH changes were detected in 75 patients (25 %), of whom 68 had HCV and 7 HBV. Hypothyroidism was detected in 39 patients (34 with HCV), of whom 25 required substitute therapy which was subsequently terminated in 5 patients. Hyperthyroidism with transient suppressive therapy with carbimazole developed in 4 HCV patients. In 32 patients, TSH changes were assessed as subclinical hypothyroidism. Abnormal T₃ values were found in 188 (62 %) and T₄ in 49 (16 %) patients; these changes practically did not correlate with TSH changes. Autoantibodies were detected in 54 (18 %) patients of whom 30 were also found to have changes in TSH.

Conclusions: In a group of 304 patients treated with IFN alpha for chronic hepatitis, thyroid disease with changes in TSH were observed in a quarter of patients; hypothyroidism clearly prevailed. Thyroid diseases developed in half of the patients with the presence of antithyroid antibodies.

Keywords: chronic hepatitis B and C, interferon alpha therapy, thyroid dysfunction, antithyroid antibodies

Klin mikrobiol inf lék 2014;20(3):92–97

Adresa: MUDr. Irena Orságová, Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba,
e-mail: irena.orsagova@post.cz

Došlo do redakce: 4. 9. 2014

Přijato k tisku: 26. 9. 2014

Úvod

Postižení štítné žlázy je častým nežádoucím účinkem, který provází léčbu konvenčním nebo pegylovaným IFN u pacientů s chronickými VHB a VHC. Prevalence poruch štítné žlázy je uváděna v širokém rozmezí 1–35 %, což souvisí zejména s tím, zda se hodnotí pouze laboratorní abnormality nebo až klinická manifestace onemocnění, přitom častěji jsou postiženy ženy, pacienti s hepatitidou C, obvyklý je rozvoj hypotyreózy, zatímco hypertyreóza je vzácná [1,2,3]. Pro rozvoj tyreopatie je pravděpodobně rozhodující imunomodulační účinek IFN, četnost tyreopatií podle některých autorů narůstá s délkou léčby, ale příliš ji neovlivňuje dávka IFN [4]. Zvažována je exacerbace dosud latentní autoimunitní tyreoiditidy během léčby IFN, onemocnění se většinou manifestuje jako hypotyreóza, které u dvou třetin pacientů předchází destruktivní hypertyreoidismus, za rizikový faktor je považována přítomnost protilátek proti štítné žláze [1,5]. Méně pravděpodobný je přímý toxický vliv IFN na štítnou žlázu [1].

Nejdůležitějším parametrem pro sledování funkce štítné žlázy je stanovení TSH, stanovení thyroxinu (T4) a trijódthyroninu (T3), resp. jejich volných frakcí je méně přínosné, neboť jejich nespecifické změny jsou poměrně časté i při eufunkci štítné žlázy [6]. V úvodu subklinické hypotyreózy bývá snižená hodnota TSH s následným vzestupem TSH při manifestní hypotyreóze (viz *tabulka 1*), přitom T3 (fT3) a T4 (fT4) mohou zůstat v referenčních mezích. Uvedené laboratorní změny se vyskytují u 2–10 % běžné populace, většina autorů v této situaci neindikuje substituční léčbu L-thyroxinem, protože hodnota TSH se postupně normalizuje až u 50 % osob, včetně pacientů s protivirovou léčbou [7]. Substituční léčba hypotyreózy v průběhu léčby IFN je endokrinologem zpravidla indikována až při vysokých hodnotách TSH nad 10 mU/l, při hodnotě TSH 5–10 mU/l se vzhledem k cévním rizikům zvažuje léčba individuálně, zejména při klinických projevech nebo při ultrazvukových známkách strumy [7]. Hypertyreóza mívá klinicky závažnější průběh, nízké hodnoty TSH a vysoké hladiny T3 (fT3) a T4 (fT4), tyreostatická léčba karbimazolem je doporučována při trvalém snížení hodnot TSH pod 0,1 mU/l [8].

Na Klinice infekčního lékařství v Ostravě bylo hodnoceno postižení štítné žlázy v souvislosti s léčbou IFN u 304 pacientů, výsledky jsou uvedeny v dalším textu.

Soubor pacientů a metody

V letech 1992 až 2013 byla na Klinice infekčního lékařství v Ostravě zahájena léčba konvenčním nebo pegylovaným interferonem alfa u 367 pacientů, z nichž 307 pacientů mělo chronickou VHC a 60 pacientů chronickou VHB.

Postižení štítné žlázy bylo retrospektivně hodnoceno v souboru 304 pacientů, kteří měli před protivirovou léčbou eufunkci štítné žlázy a současně měli stanovení TSH před a po ukončení léčby IFN, případně alespoň prokázanou změnu TSH v průběhu

léčby, pokud chybělo stanovení TSH po léčbě. Soubor zahrnoval 190 mužů a 114 žen, přitom 256 pacientů mělo VHC (157 mužů, 99 žen) a 48 pacientů VHB (33 mužů, 15 žen). Opakovaně bylo IFN léčeno 82 pacientů, přitom dvě léčby mělo 61 pacientů, tři léčby 17 pacientů, čtyři léčby 3 pacienti, pětkrát byl léčen jeden pacient. Při první nebo opakované léčbě byl použit konvenční IFN u 212 pacientů a pegylovaný IFN u 200 pacientů. Věková struktura pacientů je zobrazena v *grafu 1*; u pacientů s opakovanou léčbou je uveden věk při zahájení první léčby IFN. Pro hodnocení tyreopatie byl před léčbou, za 6 měsíců od zahájení léčby a do 3–6 měsíců po ukončení léčby IFN stanovován TSH (norma 0,45–4,7 mIU/l), T4 (norma 9,5–24 pmol/l, metoda Abbott Architect) nebo od 1997 volný thyroxin (fT4, norma 7,9–14,4 pmol/l, metoda Beckman Coulter), T3 (norma 0,7–2,1 nmol/l, metoda Abbott Architect), od 2010 volný trijódthyronin (fT3, norma 3,8–6,0 pmol/l, metoda Beckman Coulter). Současně byly stanovovány protilátky proti thyroglobulinu (anti-TGB) a protilátky proti mikrosomální frakci štítné žlázy (anti-TPO) s hodnocením negativní a pozitivní (tato skupina zahrnovala laboratorní hodnocení pozitivní nebo slabě pozitivní). TSH bylo vyšetřeno u všech 304 pacientů, hormony T3 nebo T4 u 300 pacientů a autoprotilátky u 289 pacientů.

U pacientů byly hodnoceny laboratorní a klinické známky dysfunkce štítné žlázy v závislosti na pohlaví, věku, typu virové hepatitidy, typu a délce protivirové léčby a u VHC na dosažení setrvalé virologické odpovědi (SVR). Při výraznějších změnách TSH, zejména při hodnotách TSH nad 5 nebo pod 0,1 mIU/l proběhla konzultace s endokrinologem, který rozhodoval o případné léčbě tyreopatie a následně tuto léčbu řídil.

Tabulka 1
Laboratorní nálezy při tyreopatiích

		TSH	(f)T3, (f)T4
hypotyreóza	subklinická	↓	norma
	rozvinutá	↑	↓ nebo norma
hypertyreóza		↓	↑↑

Tabulka 2
Změny parametrů štítné žlázy v souboru 304 pacientů léčených IFN

Parametr	Počet pacientů (n = 304)	Pouze VHC (n = 256)	Pouze VHB (n = 48)
Změna TSH	75 (25 %)	68 (27 %)	7 (15 %)
Změna (f)T3	188 (62 %)	159 (62 %)	29 (60 %)
Změna (f)T4	49 (16 %)	45 (18 %)	4 (8 %)
Přítomnost anti-TGB	40 (13 %)	33 (13 %)	7 (15 %)
Přítomnost anti-TPO	34 (11 %)	33 (13 %)	1 (2 %)
Celkem změn	386	338	48

Výsledky

Absolutní počty změn TSH, T3, T4 a autoprotilátek proti štítné žláze v souboru 304 pacientů jsou uvedeny v *tabulce 2*, přičemž v tabulce není rozlišeno zvýšení nebo snížení hladin hormonů štítné žlázy. Jednalo se o 386 změn, přitom ve většině parametrů byla četnost změn vyšší u pacientů s VHC.

Změna libovolného parametru štítné žlázy byla prokázána u 220 z 304 pacientů (72 %), což vyplývá z *tabulky 3*, v níž jsou uvedeny počty pacientů s izolovanými nebo kombinovanými změnami parametrů štítné žlázy při léčbě IFN. Změny byly prokázány u 130 ze 190 mužů (68 %) a u 90 ze 114 žen (79 %), změny byly o něco častější u pacientů s VHC (73 %) než u pacientů s VHB (69 %). Libovolné změny byly prokázány u 80 ze 186 pacientů (43 %) do 40 let a u 60 ze 118 pacientů (51 %) starších.

Nejčastější, ale většinou klinicky nevýznamné byly změny T3 (u 62 % pacientů). Změny TSH, které nejpřesněji určují změny funkce štítné žlázy, byly prokázány u 75 z 304 pacientů (25 %), proto jsou další analýzy vztaženy k hodnotám TSH.

Změny TSH

Změny TSH byly prokázány u 40 ze 190 mužů (21 %) a u 35 z 114 žen (31 %). Závislost první zaznamenané změny TSH na věku pacientů je uvedena v *tabulce 4*. Nejmladšímu pacientovi se změnou TSH bylo 5 let, nejstaršímu 71 let, nejvyšší podíl změn TSH (29 %) byl zjištěn ve věkové kategorii 21–40 let.

První změny TSH byly zaznamenány u 69 z 304 pacientů (23 %) během první protivirové léčby, u 5 pacientů během druhé léčby a u posledního pacienta až při čtvrté léčbě IFN. Přitom u 53 pacientů (17 % z 304) byla první změna TSH zaznamenána za půl roku po zahájení protivirové léčby, u zbývajících 16 pacientů (5 % z 304) v druhé polovině léčby nebo po jejím ukončení. V podskupině 82 opakovaně léčených pacientů mělo změny TSH během první léčby 18 pacientů. V průběhu druhé léčby IFN byla změna TSH zjiš-

těna u 5 z 64 pacientů s normou TSH během první léčby (8 %), v celém souboru se jednalo u 2 % pacientů.

Při první léčbě konvenčním IFN byly změny TSH zjištěny u 44 ze 174 pacientů (25 %), přitom se jednalo o 8 z 16 pacientů s konsenzuálním IFN, obdobně při první léčbě pegylovaným IFN byly změny zjištěny u 25 ze 130 pacientů (19 %).

Změny TSH ve vztahu k dosažení SVR byly hodnoceny v skupině 249 z 256 pacientů s VHC, neboť u 7 pacientů chybí hodnocení SVR 6 měsíců po ukončení léčby. Změny TSH byly prokázány u 39 ze 140 pacientů se SVR (28 %) a u 24 ze 109 pacientů bez SVR (22 %).

Autoprotilátky a změny TSH

Autoprotilátky proti štítné žláze byly prokázány u 54 z 304 pacientů (18 %), viz *tabulka 5*. Jednalo se o 47 z 256 pacientů (18 %) s VHC (23 mužů, 24 žen) a 7 ze 48 pacientů (15 %) s VHB (3 muži, 4 ženy), případně o 26 ze 190 mužů (14 %) a 28 ze 114 žen (25 %). Obě autoprotilátky byly zjištěny u 20 pacientů, izolovaná pozitivita anti-TGB u 20 a anti-TPO u 14 pacientů. Už před protivirovou léčbou byly autoprotilátky prokázány u 10 z 304 pacientů (3 %), jednalo se o 5 mužů a 5 žen, 7 pacientů s VHC a 3 pacienty s VHB. Autoprotilátky byly prokázány během první léčby IFN u 37 z 294 pacientů bez autoprotilátek před léčbou (13 %), během další léčby u 7 ze 75 pacientů (9 %) také bez autoprotilátek při první léčbě. V důsledku léčby IFN se objevily autoprotilátky u 40 z 249 pacientů (16 %) s VHC a u 4 ze 45 pacientů (9 %) s VHB, kteří neměli autoprotilátky před léčbou. Po ukončení léčby IFN došlo u 9 pacientů k vymizení autoprotilátek (5 s VHC, 4 s VHB), přitom u 3 pacientů vymizely autoprotilátky prokazatelně ještě před protivirovou léčbou.

Změny TSH byly prokázány u 30 z 54 (56 %) pacientů s průkazem autoprotilátek (29 s VHC, 1 s VHB). Izolovaná pozitivita anti-TGB nebo anti-TPO byla zjištěna shodně u 7 pacientů, u 16 pacientů byly prokázány obě autoprotilátky současně. Přitom ke změně TSH došlo u 16 z 20 pacientů

Tabulka 3
Izolované a kombinované změny parametrů štítné žlázy u 304 pacientů

Změny parametrů	Počet pacientů (n = 304)	Pouze s VHC (n = 256)	Pouze s VHB (n = 48)
TSH	9 (3 %)	9 (4 %)	0
(f)T3 nebo (f)T4	123 (40 %)	103 (40 %)	20 (42 %)
Anti-TGB nebo anti-TPO	8 (3 %)	7 (3 %)	1 (2 %)
TSH + (f)T3 nebo (f)T4	36 (12 %)	30 (12 %)	6 (13 %)
TSH + anti-TGB nebo anti-TPO	3 (1 %)	3 (1 %)	0
(f)T3 nebo (f)T4 + anti-TGB nebo anti-TPO	16 (5 %)	11 (4 %)	5 (10 %)
TSH + (f)T3 nebo (f)T4 + anti-TGB nebo anti-TPO	27 (9 %)	26 (10 %)	1 (2 %)
Celkem pacientů	220 (72 %)	187 (73 %)	33 (69 %)

(80 %) s pozitivitou obou autoprotilátek, z nich 13 pacientů vyžadovalo substituční a jeden pacient tyreostatickou léčbu.

Změny TSH se rozvinuly u 6 z 10 pacientů (3 muži, 3 ženy, 5 s VHC, 1 s VHB) s přítomností autoprotilátek už před protivirovou léčbou, u všech pacientů mělo onemocnění následný charakter hypotyreózy. Autoprotilátky indukované léčbou IFN byly prokázány u 2 ze 4 pacientů s následným rozvojem hypertyreózy.

T3 a T4 a změny TSH

Aktuální výsledky T3 a T4 při prvním zjištění zvýšené nebo snížené hodnoty TSH u 75 pacientů jsou uvedeny v tabulce 6 a 7. Všech 36 pacientů se zvýšením TSH bylo zahrnuto do skupiny pacientů s hypotyreózou.

Ve skupině 39 pacientů uvedených v tabulce 7 se sníženou hodnotou TSH nebylo možné zpočátku rozlišit, zda se jedná o úvodní stádia hypotyreózy nebo hypertyreózy. U většiny pacientů byly prokázány normální nebo mírně zvýšené hodnoty T3 nebo T4. Pouze u 4 pacientů hodnoty T3 nebo T4 přesahovaly dvojnásobek normy, z nich u 2 pacientů s izolovanou elevací T4 (fT4 38,6, 51,6 pmol/l) se rozvinula hypertyreóza, u třetího pacienta se zvýšením obou hormonů hypotyreóza (T3 7,22 nmol/l, fT4 38,2 pmol/l), u posledního pacienta s izolovanou elevací T3 (19,6 nmol/l) došlo ke spontánní úpravě TSH i T3.

Ve skupině 39 pacientů s úvodním snížením TSH byla hypertyreóza prokázána u 4 pacientů, u 3 pacientů (2 s VHC, 1 s VHB) hypotyreóza s dvoufázovým průběhem s úvodním poklesem a následným vzestupem TSH. U zbývajících 32 pacientů se pravděpodobně jednalo o subklinickou hypotyreózu.

Hypotyreóza

Hypotyreóza se rozvinula u 39 z 304 pacientů (13 %), a to u 16 ze 190 mužů (8 %) a 23 ze 114 žen (20 %), u 34 z 256 pacientů (13 %) s VHC (12 mužů, 22 žen) a 5 ze 48 pacientů (10 %) s VHB (4 muži, 1 žena). Dvoufázový průběh s úvodním snížením na následným zvýšením TSH byl prokázán pouze u 3 z 39 pacientů s hypotyreózou.

Substituční léčba L-tyroxinem byla endokrinologem indikována u 25 z 39 pacientů (64 %), při vztažení k celému souboru to bylo 25 z 304 pacientů (8 %). Jednalo se o 7 ze 190 mužů (4 %) a 18 z 114 žen (16 %), přitom 23 pacientů mělo VHC (9 % z 256) a 2 pacienti VHB (4 % ze 48). Substituční léčbu indikoval endokrinolog u 19 pacientů s hodnotou TSH nad 10 (nejvyšší hodnota 100 mU/l) a u 6 pacientů s hodnotou TSH 5–10 mU/l, přitom jen u 2 pacientů byly současně snížené hodnoty T4 při normě T3. Jediný pacient s hypotyreózou byl přechodně léčen karbimazolem pro zvažovanou hypertyreózu (TSH pod 0,03 mU/l, fT4 38,2 pmol/l a T3 7,22 nmol/l), přitom neměl klinické příznaky hypertyreózy.

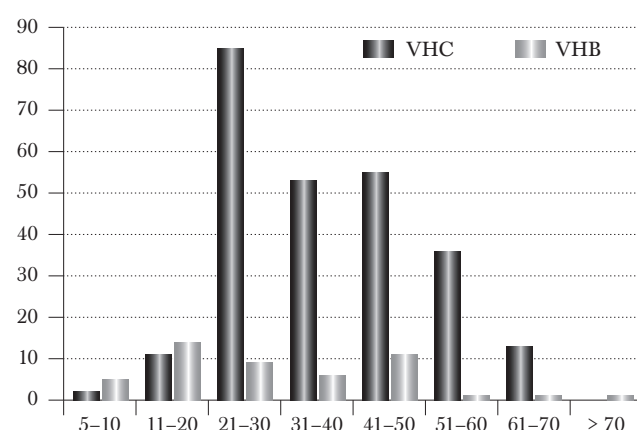
Ve skupině 25 pacientů se substituční léčbou byla po ukončení léčby IFN ukončena substituční léčba u 5 pacientů, u 4 pacientů do 2–4 let a u posledního pacienta po 9 letech. Substituční léčba byla ponechána u 18 pacientů, dva pacienti nebyli po léčbě vyšetřeni. Ve skupině 14 pacientů se zvýšením TSH, kteří neměli substituční léčbu, došlo ke

spontánní normalizaci TSH u 6 pacientů během léčby IFN, u 4 pacientů po jejím ukončení, u 4 pacientů výsledky chybí.

Subklinická hypotyreóza

Podskupina pacientů s pravděpodobnou subklinickou hypotyreózou zahrnovala 32 pacientů se snížením TSH. Tento předpoklad podporuje i spontánní úprava TSH u 24 z 32 pacientů v našem souboru během protivirové léčby nebo po ní. Endokrinolog indikoval substituční léčbu u 7 pacientů, tato

Graf 1
Věková struktura souboru 304 pacientů léčených IFN



Tabulka 4
První změny TSH podle věku u 304 pacientů

Věková skupina (roky)	Počet pacientů (n = 304)	Pacienti se změnami TSH (n = 75)
0–20	32	3 (9 %)
21–40	154	44 (29 %)
41–60	103	26 (25 %)
> 60	15	2 (13 %)

Tabulka 5
Přítomnost autoprotilátek proti štítné žláze ve vztahu k léčbě IFN u 54 pacientů

	Během léčby IFN		
	Před léčbou IFN	do 6 měsíců	nad 6 měsíců
anti-TGB	4	6	10
anti-TPO	2	8	4
anti-TGB + anti-TPO	4	11	5
Celkem	10	25	19

byla ukončena dosud pouze u 1 pacienta. Substituční léčba trvá u 6 pacientů, u jednoho pacienta 1 rok a u dalších 5 pacientů 4–12 let po ukončení léčby IFN.

Hypertyreóza

Hyperfunkce štítné žlázy se rozvinula u 4 z 39 pacientů (10 %) se sníženou hodnotou TSH, všichni měli zvýšené hladiny (f)T4 a (f)T3 a vyžadovali léčbu karbimazolem. Jednalo se o 2 muže a 2 ženy, všichni měli VHC, pacient s přechodnou tyreostatickou léčbou karbimazolem s následným rozvojem hypotyreózy není do této skupiny zahrnut.

Klinicky závažnější průběh byl zaznamenán u jediného pacienta, u kterého byl ve věku 25 let ve 48. týdnu léčby konvenčním IFN pozorován závažnější průběh hypertyreózy charakteru Gravesovy-Basedowovy nemoci s klinickými projevy, které zahrnovaly nervozitu, třes, tachykardii, hmotnostní úbytek a exoftalmus. Při stanovení diagnózy měl pacient TSH 0,01 mU/l, fT4 51,6 pmol/l, T3 5,88 nmol/l a negativitu autoprotilátek. Pacient byl léčen karbimazolem a po dobu 5 měsíců i trimepranolem pro tachykardii. Pacient nedosáhl během první léčby SVR, následně byl léčen kombinací s pegylovaným IFN s dosažením SVR. Během druhé léčby došlo k rozvoji autoprotilátek anti-TGB a anti-TPO. Pacient byl s přestávkami léčen karbimazolem 4 roky, s výjimkou menšího exoftalmu u něj došlo k úpravě klinického stavu.

U 3 pacientů (1 muž, 2 ženy) ve věku 27, 29 a 44 let byl průběh hypertyreózy mírnější, prakticky pouze s laboratorními změnami. U všech 3 pacientů se hypertyreóza manifestovala během první protivirové léčby, všichni dosáhli SVR. U všech pacientů byla tyreostatická léčba ukončena, u dvou pacientů do 4 let, u zbývajících 2 pacientů přesný časový údaj není znám.

Diskuze

V našem souboru byly změny TSH v důsledku léčby IFN prokázány u 75 z 304 pacientů (25 %), a to u 27 % pacientů s VHC a 15 % pacientů s VHB. Vyšší podíl tyreopatií u pacientů s VHC, který byl zjištěn i v našem souboru, je vysvětlován tím, že antigeny viru hepatitidy C mají některé shodné sekvence aminokyselin s antigeny štítné žlázy [9].

Nejdůležitějším markerem sledování funkce štítné žlázy je TSH, stanovení T3 a T4 není většinou přínosné, neboť k nespecifickým změnám při eufunkci štítné žlázy dochází poměrně často [6]. V našem souboru byly změny T3 nebo T4 zjištěny u 202 pacientů, přitom pouze 36 z nich mělo současně změny TSH. Nejčastější abnormalita byla zaznamenána při hodnocení T3, vyskytla se u 188 z 304 pacientů (62 %), z čehož vyplývá relativní nevýznamnost hodnocení uvedeného parametru.

Změny TSH v našem souboru byly prokázány u 31 % žen a 21 % mužů, pro hypotyreózu byla substituční léčba zahájena u 7 ze 190 mužů (4 %) a u 18 ze 114 žen (16 %), což je v souladu s literárními údaji, podle nichž jsou poruchy štítné žlázy u žen 3–7krát častější než u mužů [2,9,10–12].

V literatuře se většinou uvádí, že poruchy funkce štítné žlázy jsou častější u starších pacientů [13]. V našem souboru byl zjištěn nejvyšší počet změn TSH ve věkové skupině 21–40 let (29 %), což mohl zejména ovlivnit malý počet pacientů starších 60 let. Změny TSH byly zjištěny u 53 ze 75 našich pacientů do půl roku od zahájení léčby IFN, u 16 pacientů v druhé polovině první léčby a pouze u 6 pacientů při opakované léčbě, což není v souladu s některými literárními zdroji, podle nichž opakovaná léčba IFN zvyšuje riziko tyreopatií [4].

V našem souboru byly zaznamenány změny TSH při první protivirové léčbě u 44 ze 174 pacientů (25 %) léčených konvenčním IFN a 25 ze 130 pacientů (19 %) léčených pegylovaným IFN, při podání konsenzuálního IFN byly změny TSH pozorovány u 8 ze 16 pacientů. Naše výsledky jsou ve shodě s literaturou, podle studií pegylovaný IFN nezpůsobuje vyšší podíl tyreopatií ve srovnání s konvenčním IFN, vyšší četnost tyreopatií u konsenzuálního IFN je vysvětlována větším cytotoxickým efektem rekombinantní molekuly IFN [5,14].

Nepanuje dosud shoda, zda existuje souvislost rozvoje tyreopatie s dosažením SVR. Někteří autoři nenalezli významnou souvislost, zatímco jiní považují rozvoj dysfunkce štítné žlázy za dobrý prognostický faktor v dosažení SVR [3,12,13,15]. V našem souboru změny TSH byly zjištěny u 28 % pacientů s dosažením SVR a u 22 % pacientů bez SVR.

Přítomnost antityreoidálních autoprotilátek je pokládána za významný rizikový faktor pro vznik tyreopatií během protivirové léčby, přitom autoprotilátky byly nalezeny častěji u pacientů s VHC než s VHB (20–42 % vs.

Tabulka 6

Laboratorní nálezy u 36 pacientů při prvním zjištění zvýšené hodnoty TSH

	(TSH ↑)	(f)T4			(f)T3		
		Norma	↑	↓	Norma	↑	↓
VHC	32	20	1	11	22	6	3
VHB	4	1	0	3	3	1	0
Celkem	36	21	1	14	25	7	3

Tabulka 7

Laboratorní nálezy u 39 pacientů při prvním zjištění snížené hodnoty TSH

	(TSH ↓)	(f)T4			(f)T3		
		Norma	↑	↓	Norma	↑	↓
VHC	36	29	7	0	17	19	0
VHB	3	2	1	0	2	1	0
Celkem	39	31	8	0	19	20	0

5–10 %) [9,14,16]. V našem souboru byly autoprotilátky prokázány u 54 z 304 pacientů (18 %), jen mírně převažovali pacienti s VHC nad VHB (18 % vs. 15 %), častější byl výskyt u žen než u mužů (25 vs. 14 %).

V našem souboru byly změny TSH prokázány u 30 z 54 pacientů (56 %) s pozitivitou autoprotilátek, přitom v celém souboru 304 pacientů byly abnormality TSH zjištěny jen u 25 % pacientů. HCV infekce je pokládána za predispoziční faktor rozvoje autoimunitní tyreoiditidy, u některých pacientů jsou autoprotilátky prokazovány už před protiviřivou léčbou [9,11,14,16]. V našem souboru byly autoprotilátky před léčbou prokázány u 10 z 304 pacientů (3 %), následně byly změny TSH zjištěny u šesti z nich během léčby IFN, přitom 5 pacientů mělo VHC. U našich pacientů byl prokázán častější rozvoj tyreopatie při přítomnosti obou autoprotilátek (anti-TGB a anti-TPO), neboť u 16 z 20 pacientů (80 %) s oběma autoprotilátkami došlo ke změně TSH, často s nutností substituční léčby.

Podle literárních zdrojů se autoprotilátky objevují většinou jen během první protiviřivé léčby [7]. Ale v našem souboru byly nově zjištěny u 13 % pacientů během první protiviřivé léčby a u 9 % pacientů během opakované protiviřivé léčby.

V našem souboru bylo 32 pacientů s úvodním snížením TSH, kteří byli zařazeni do skupiny pacientů s pravděpodobnou subklinickou hypothyreózou. Je to v souladu s literárními údaji, které uvádějí, že se u většiny pacientů onemocnění štítné žlázy v průběhu léčby IFN manifestuje jako hypothyreóza, což bývá až u 66 % pacientů následkem přechodného destruktivního hypertyreoidismu [5]. Vzhledem k relativně častému rozvoji poruch štítné žlázy při léčbě IFN je v současné době doporučeno sledování TSH v tříměsíčních intervalech. Pokud je zachycena zvýšená hodnota TSH, onemocnění má prakticky vždy charakter hypothyreózy, při snížené hodnotě TSH není další vývoj onemocnění jednoznačný. V našem souboru byla snížená hodnota TSH zjištěna u 39 pacientů, z nichž pouze 4 následně rozvinuli hypertyreózu, 3 pacienti hypothyreózu po následném vzestupu TSH. U většiny ze zbývajících 32 pacientů se pravděpodobně jednalo o subklinickou hypothyreózu, která je častá nejen během protiviřivé léčby IFN, ale i v běžné populaci, kde se vyskytuje u 2–10 % osob [7]. Tento předpoklad podporuje i spontánní úprava TSH u 24 z 32 pacientů v našem souboru.

Pacienty je nutné sledovat déle i po ukončení léčby IFN, neboť k úpravě dysfunkce štítné žlázy v časovém odstupu dochází asi u 50 % pacientů [6,7]. V našem souboru byla u všech 4 pacientů s hypertyreózou ukončena léčba karbimazolem, substituční léčba hypothyreózy byla ukončena

u 5 z 25 pacientů, u jednoho pacienta až po 9 letech od ukončení protiviřivé léčby.

Závěr

Poruchy štítné žlázy se vyskytují u čtvrtiny pacientů s chronickými hepatitidami v průběhu léčby IFN. Pro jejich diagnostiku je nejdůležitější opakované stanovení TSH, přínosným je i současné sledování autoprotilátek anti-TGB a anti-TPO, jejichž přítomnost, obzvláště současná, je dobrým prognostickým faktorem rozvoje tyreopatie v důsledku protiviřivé léčby IFN.

Literatura

- Husa P. Terapie chronických virových hepatitid. In Husa P. Virové hepatitidy. Praha: Galén; 2005. s. 90–91.
- Gelu-Simeon M, Burlaud A, Young J, et al. Evolution and predictive factors of thyroid disorder due to interferon alpha in the treatment of hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2009;15(3):328–333.
- Dalgard O, Bjoro K, Hellum K, et al. Thyroid dysfunction during treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha: no association with either interferon dosage or efficacy of therapy. *J Intern Med.* 2002;252(4):377–8.
- Jacobs EL, Clare-Salzler MJ, Chopra IJ, et al. Thyroid function abnormalities associated with the chronic outpatient administration of recombinant interleukin-2 and recombinant interferon. *J Immunother.* 1991;10:448–455.
- Carella C, Mazziotti G, Amato L, et al. Interferon-alpha-related thyroid disease: pathological, epidemiological, and clinical aspects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):3656–3661.
- Lukeš J, Koranda P. Laboratorní diagnostika onemocnění štítné žlázy. *Interní medicína pro praxi.* 2001;3:120–123.
- Pearce SHS, Razvi S. Practical approach to management of subclinical hypothyroidism. *Thyroid International.* 2012 Aug;(1)[11]. Available from: <http://www.thyroidink.com/>.
- Tran A, Quaranta JF, Benzaken S, et al. High prevalence of thyroid antibodies in a prospective series of patients with chronic hepatitis C before interferon therapy. *Hepatology.* 2002;36(1):S195–S200.
- Fernandez-Soto L, Gonzales A, Escobar-Jimenez F, et al. Increased risk of autoimmune thyroid disease in hepatitis C vs. hepatitis B before, during, and after discontinuing interferon therapy. *Arch Intern Med.* 1998;158:1445–1448.
- Hsieh MC, Yu ML, Chuang WL, et al. Virologic factors related to interferon induced thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Endocrinol.* 2000;142:431–437.
- Prummel MF, Laurberg P. Interferon and autoimmune thyroid disease. *Thyroid.* 2003;13:547–551.
- Nadeem A, Aslam M, Khan DA, et al. Effect of combined interferon alpha and ribavirin therapy on thyroid functions in patients with chronic hepatitis C. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan.* 2009;19(2):86–89.
- Andrade LJ, Atta AM, D'Almeida Junior A, et al. Thyroid dysfunction in hepatitis C individuals treated with interferon-alpha and ribavirin—a review. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(2):144–148.
- Mazziotti G, Sorvillo F, Stornaiuolo G, et al. Temporal relationship between the appearance of thyroid autoantibodies and development of destructive thyroiditis in patients undergoing treatment with two different type-1 interferons for HCV-related chronic hepatitis: a prospective study. *J Endocrinol Invest.* 2002;25:624–630.
- Tran HA, Malcolm Reeves GE, Gibson R, et al. Development of thyroid diseases in the treatment of chronic hepatitis C with alpha-interferon may be a good prognosticator in achieving a sustained virological response: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:1163–1168.
- Preziati D, La Rosa L, Covini G, et al. Autoimmunity and thyroid function in patients with chronic active hepatitis treated with recombinant interferon-2a. *Eur J Endocrinol.* 1995;132:587–593.

***Corynebacterium imitans* izolované z hemokultury u pacienta se suspektní bakterémií – první izolace v humánním klinickém materiálu v České republice**

P. JEŽEK¹, J. ZAVADILOVÁ², R. KOLÍNSKÁ³, P. ŠVEC⁴, J. GUTTWIRTH⁵, P. PETRÁŠ⁶

¹Odd. klinické mikrobiologie a parazitologie, Oblastní nemocnice Příbram,

²Národní referenční laboratoř pro difterii, Státní zdravotní ústav, Praha,

³Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC), Státní zdravotní ústav, Praha,

⁴Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno;

⁵Plicní oddělení, Oblastní nemocnice Příbram,

⁶Národní referenční laboratoř pro stafylokoky, Státní zdravotní ústav, Praha

SOUHRN

Ježek P., Zavadilová J., Kolínská R., Švec P., Guttwirth J., Petráš P.: ***Corynebacterium imitans* izolované z hemokultury u pacienta se suspektní bakterémií-první izolace v humánním klinickém materiálu v České republice**

Současný pohled na klinický význam nedifteroidních druhů korynebakterií izolovaných z humánního klinického materiálu se v posledních desetiletích značně změnil a v řadě případů se přímá etiologická souvislost předpokládá nebo byla již prokázána.

V tomto sdělení předkládáme kazuistiku suspektní bakterémie u starší hospitalizované ženy s izolací velmi vzácného druhu *Corynebacterium imitans*. Etiologický význam izolovaného mikroorganismu zůstává však nejasný. Cílem této práce nebylo prokázat etiologickou významnost *C. imitans*, ale poukázat na výskyt velmi raritního druhu, který považujeme za první izolaci z humánního klinického materiálu v České republice.

Klíčová slova: korynebakteria, *Corynebacterium imitans*, bakterémie

SUMMARY

Ježek P., Zavadilová J., Kolínská R., Švec P., Guttwirth J., Petráš P.: ***Corynebacterium imitans* isolated from blood culture in a patient with suspected bacteremia – the first isolation from human clinical material in the Czech Republic**

The current view of the clinical importance of nondiphtherial corynebacteria recovered from human clinical material has changed considerably in recent decades; in many cases, a direct etiological role is assumed or has already been demonstrated.

Presented is a case of suspected bacteremia in a hospitalized elderly woman with isolation of the very rare species *Corynebacterium imitans* from blood culture. However, the etiological significance of the isolated microorganism remains unclear. The aim was not to demonstrate the etiological significance of the isolated *C. imitans* strain but to report the occurrence of this very rare species which is considered to be the first isolation from humans in the Czech Republic.

Keywords: corynebacteria, *Corynebacterium imitans*, bacteremia

Klin mikrobiol inf lék 2014; 20(3):98–101

Adresa: MVDr. Petr Ježek, Oblastní nemocnice Příbram, Odd. klinické mikrobiologie a parazitologie, U Nemocnice 84, 261 26 Příbram 1, e-mail: petr.jezek@onp.cz

Došlo do redakce: 25. 7. 2014

Přijato k tisku: 13. 10. 2014

Úvod

Korynebakteria jsou grampozitivní aerobní nesporogenní tyčky s charakteristickým uspořádáním v mikroskopickém obraze (kyjovité tyčky často tvořící dvojice svírající ostrý úhel – tvar písmene V). Medicínský pohled na jejich patogení významnost v humánních klinických materiálech se donedávna omezoval téměř výhradně jako na saprofytickou nebo komenzální flóru. Teprve v posledních dekádech vý-

razně přibylo publikací zabývajících se touto skupinou mikroorganismů, a to nejen taxonomických, ale i klinických, s popisem mnoha kazuistik, ze kterých je zřejmé nebo se alespoň předpokládá větší či menší pravděpodobnost kauzální účasti těchto mikroorganismů v různých infekčních procesech [1–6]. Významně k těmto poznáním přispívá rozvoj moderních molekulárně genetických metod, které výrazně zasáhly do taxonomie tohoto rodu.

C. imitans popsal poprvé Funke a kol. v roce 1997 [1] u 5měsíčního dítěte rumunské národnosti cestujícího autobusem do Polska přes Ukrajinu. Po příjezdu do Polska bylo dítě hospitalizováno v nemocnici se suspektní difterií. Následně onemocnělo dalších 8 osob, které buďto cestovaly společně s touto rodinou, nebo šlo o zaměstnance hotelu, kde rodina pobývala včetně obou rodičů. Od tří osob v kontaktu (otec dítěte, řidič autobusu a recepční hotelu) byl izolován koryneformní mikroorganismus neprodukující difterický ani žádný jiný známý toxin. Tento kmen byl později popsán výše zmíněnými autory jako *C. imitans*. Bernard a kol. v roce 2002 [7] uvádějí ve své práci 6 kmenů izolovaných z hemokultury. Pět z nich pocházelo z Kanady a jeden ze Španělska. Bližší popisy kazuistik však uvedeny v této práci nejsou.

Klinická prezentace

Žena ve věku 78 let byla přijata v červnu 2013 na oddělení TRN Oblastní nemocnice Příbram. Důvodem byly asi týdenní potíže charakteru nachlazení – produktivní kašel s expektorací světlých hlenů, zhoršená námahová dušnost, horečka. Ze vstupního vyšetření byly alterované hodnoty krevního tlaku 180/85, srdeční frekvence 100/min, tělesná teplota 38,5 °C a tepová frekvence 80–120/min, ostatní fyzikální nález byl normální.

Vstupní hodnota C reaktivního proteinu 119 mg/l a leukocytózy $20,6 \times 10^9/\text{ml}$ se v průběhu léčby postupně upravily až na hodnoty 15,8 mg/l resp. $12,6 \times 10^9/\text{ml}$.

Na skiagramu hrudníku byla zaznamenána akcentace vasculárně intersticiální kresby až splývavého charakteru při pravém plicním hilu, nález byl hodnocen jako suspektní záneřlivá infiltrace. Na kontrolním snímku v týdenním odstupu již tento nález nebyl popsán.

Pracovní diagnóza pravostranné pneumonie nebyla změněna a pacientka byla po léčbě potencovanými aminopeniciliny, která vedla ke klinickému zlepšení při odpovídajícím vývoji laboratorních ukazatelů zánětu a rentgenového nálezu, propuštěna do ambulantní péče.

Mikrobiologické vyšetření

Z etiologicky významných mikrobiologických nálezů byl zvažován především *Staphylococcus aureus* izolovaný z materiálu z dýchacích cest a na tomto základě byla ordinována i antibiotická terapie – amoxicilin/kyselina klavulanová v dávce $3 \times 1,2 \text{ g/d}$. Kmen vykazoval dobrou citlivost mimo indikovaného preparátu také na linkosamidy, kotrimoxazol, doxycyklin a makrolidová antibiotika.

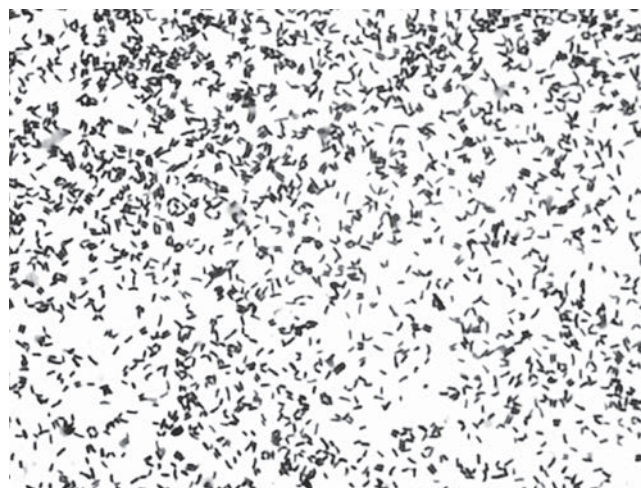
Překvapujícím nálezem byly grampozitivní koryneformní tyčky v hemokultivaci.

Mikroskopický obraz jak v materiálu z hemokultivační lahvičky, tak přímo z kultury odpovídal charakteristické morfologii příslušníků rodu *Corynebacterium*, tzn. grampozitivní, nesporogenní, difteroidní, kyjovité tyčky s výskytem typických V forem (obr. 1).

Na krevním agaru s 5% ovčích erytrocytů kmen rostl velmi dobře při 37 °C za aerobních i mikroaerofilních podmínek a tvořil lesklé bělavé mazlavé kolonie bez hemolýzy (obr. 2)

K druhové identifikaci byla použita souprava ELIChrom CORYNE (ELITech MICROBIO, Signes, Francie). Testy byly hodnoceny vždy po 24, 48 a 72 hodinách. Biochemický profil i po 72 hodinové kultivaci však neodpovídal žádnému kódu zařazenému v databázi (kód 00181022 – viz tabulka 1, databáze tento druh neobsahuje!). Z toho důvodu byl kmen zaslán do Státního zdravotního ústavu v Praze k další identifikaci. Z doplňkových biochemických testů stojí za zmínku pozitivní CAMP test a pozitivní kataláza. Kmen byl rezistentní k vibrostatickému diagnostiku pteridin O129, API Coryne skóre 1100325 (API Coryne neobsahuje druh *C. imitans*!); všechny tyto parametry byly v souladu s literárními údaji [1,7]. Při identifikaci metodou MALDI-TOF MS bylo dosaženo score value = 1.967

Obr. 1
Mikroskopický obraz kultury *C. imitans*



Legenda: Barvení Gram, zvětšení 1 000×. Foto P. Ježek

Obr. 2
Kultura *C. imitans* na krevním agaru za 24 hodin při 37 °C



Legenda: Foto P. Ježek

(1,7–1,999 pravděpodobná rodová identifikace; 2,000–2,299 pravděpodobná identifikace do druhu; 2,300–3,000 vysoce pravděpodobná identifikace do druhu).

Na pracovišti České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně byla provedena typizace kmene metodou rep-PCR s primerem (GTG)₅ Švec a kol. [8]. Získaný profil byl srovnán s typovým kmenem *C. imitans* CCM 4676^T izolovaným Funkem v roce 1997 (obr. 3). Podobnost získaných rep-PCR profilů byla kalkulována Pearsonovým korelačním koeficientem v programu BioNumerics 7.1 (Applied Maths). Izolovaný kmen *C. imitans* K4005 vykázal s typovým kmenem *C. imitans* CCM 4676^T podobnost 72,2 % a také vi-

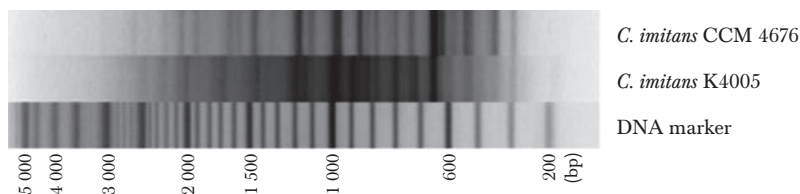
zuálním hodnocením je zřejmé, že získané rep-PCR profily vykazují část shodných PCR fragmentů. Možnost srovnání s více kmeny *C. imitans* by umožnila přesnější a spolehlivější vyhodnocení výsledku analýzy, avšak další kmeny tohoto druhu nejsou k dispozici. Jednotlivé druhy korynebakterií, zahrnuté v rep-PCR databázi pracoviště České sbírky mikroorganismů, však vykazují obdobně vysokou vnitrodruhovou heterogenitu rep-PCR profilů, což také nepřímou potvrzuje, že oba kmeny jsou i navzdory jistým odlišnostem v rep-PCR profilech zástupci stejného druhu.

Citlivost na antibiotika byla testována na Mueller–Hinton agaru s ovčím erytrocyty diskovou difúzní metodou dle doporučené metodologie EUCAST a vy-

hodnocena dle tabulky break pointů EUCAST v.4.0 pro *Corynebacterium spp.* Dobrou citlivost kmen vykazoval pouze k vankomycinu, linezolidu a rifampicinu. K ostatním testovaným preparátům (penicilin, doxycyklin, erytromycin, klindamycin a ciprofloxacín) byl jasně rezistentní.

Amoxicilin/kyselina klavulanová byly testovány metodou E testu, protože šlo o preparát zvolený k terapii a hodnota MIC byla 4,0 mg/l. EUCAST pro tento preparát nemá stanoveny break pointy, proto lze jen obtížně tuto hodnotu okomentovat.

Obr. 3
Výsledek rep-PCR typizace izolovaného kmene K4005 a typové kultury *C. imitans* CCM 4676^T



Tabulka 1
Biochemické vlastnosti izolovaného *C. imitans* ve srovnání s původně izolovaným kmenem

Izolovaný kmen				<i>C. imitans</i> sp. nov. (Funke 1997)			
Substrát	Výsledek	Substrát	Výsledek	Substrát	Výsledek	Substrát	Výsledek
CAMP	+	FRU	+	CAMP	+	FRU	+
β-GUR	-	GAL	-	β-GUR	-	GAL	-
β-GAL	-	SAC	+	β-GAL	-	SAC	+/w
α-GLU	-	ARA	-	α-GLU	-	ARA	-
MC*	-	XYL	-	MC	+	XYL	-
PAL	+	RIB	+	PAL	+	RIB	+
URE	-	MAL	+	URE	-	MAL	+
ESC	-	LAC*	-	ESC	-	LAC	+
GLU	+	MAN	+	GLU	+	MAN	+
TRE	-			TRE	-		

Legenda:

* – výsledky odlišné od původně popsaného kmene, w – jemně pozitivní reakce.

Zkratky:

β-NAG – β-galaktosaminidáza, β-GUR – β-glukuronidáza, β-GAL – β-galaktosidáza, α-GLU – α-glukosidáza, MC – esterázy a lipázy, PAL – alkalická fosfatáza, URE – urea, ESC – eskulin, GLU – glukóza, TRE – trahalóza, FRU – fruktóza, GAL – galaktóza, SAC – sacharóza, ARA – arabinóza, XYL – xylóza, RIB – ribóza, MAL – maltóza, LAC – laktóza, MAN – manóza, NT – netestováno, CAMP – CAMP test.

Diskuze

Rod *Corynebacterium* v posledních dekádách zaznamenal výrazné změny co do počtu nově popsaných druhů a také co do pohledu na jejich klinickou prezentaci. U řady z nich se předpokládá patogenní působení a u dalších je z publikovaných kazuistik důvodné podezření. Za vhodné příklady může posloužit třeba *Corynebacterium macginleyi* se zřejmou afinitou k očním tkáním [5,6] nebo *C. coyleae*, u něhož se předpokládá predispozice pro výskyt v krevním řečišti [4,7,9,10], *C. jeikeium* [2], *C. ulcerans* [3] a jiné druhy. Vhodným terénem pro korynebakteriální infekce jsou zejména imunokompromitovaní pacienti, kterých s rozvojem medicíny trvale přibývá.

C. imitans je velmi raritním druhem s dosud nevyjasněným nebo ne zcela prokázaným patogenním působením na člověka. V původním a dosud jediném popisném článku Funkeho a kol. z roku 1997 [1] autoři poukazují na možnou souvislost s difterickým one-mocněním a také na možné šíření z člověka na člověka. Takové případy byly také popsány u některých jiných

druhů korynebakterií, např. u *C. argentoratense* [11] nebo u *C. pseudodiphtheriticum* [12]. U žádného z těchto tří zmínovaných druhů nebyla prokázána produkce difterického toxinu.

V našem případě nebyly pozorovány klinické symptomy podobné diftérii. Zaznamenali jsme pouze výskyt tohoto druhu v hemokultivaci a náš pohled na izolaci z primárně sterilního materiálu není zcela objasněn. Nabízí se možnost kontaminace při odběru nebo bakterémie z neznámého zdroje. Poslední varianta může být podpořena elevovanými zánětlivými markery při vstupním vyšetření a skutečností, že toto agens dosud nebylo izolováno z kůže či sliznic člověka nebo z prostředí, aby jej bylo možno jednoznačně označit za saprofytickou flóru. Ačkoliv nebyla zcela naplněna kritéria pro hodnocení záchytu z hemokultur, domníváme se, že nelze spolehlivě považovat takové nálezy ani za kontaminaci. Na výskyt tohoto druhu v hemokulturách ukazuje také práce Bernarda a kol. z roku 2002 [7].

Autoři v této publikaci popsali dalších 6 kmenů *C. imitans* izolovaných z hemokultur převážně z Kanady [7]. Výskyt *C. imitans* v Čechách byl publikován Kopečným a kol. [13] v souvislosti se studiem intestinální mikroflóry u dětských pacientů s celiakií. Kmen však byl prokázán pouze na základě analýzy DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 16S DNA fragmentů [9], izolace přímo z klinického materiálu je nyní popsána poprvé.

Nicméně cílem této práce není potvrdit či vyloučit patogenní roli tohoto mikroorganismu, ale pouze upozornit na výskyt velmi raritního druhu v klinickém materiálu a také na možné omyly při řešení podezřelých klinických případů difterických onemocnění, které se mohou v našich podmínkách vyskytnout. Také chceme tímto článkem upozornit na důležitost přesné identifikace korynebakterií z primárně sterilních tekutin a nebo z jiných materiálů, v případech, kde tyto druhy kvantitativně převyšují ostatní flóru.

Závěr

C. imitans je pravděpodobně velmi raritně se vyskytující druh korynebakterií, alespoň dle literárních záznamů ve světové literatuře, kde je zaznamenán pouze jediný případ z klinicky suspektního difteroidního onemocnění [1]. Šest kmenů bylo izolováno z hemokultur převážně z Kanady [7].

V Čechách byl první výskyt publikován v souvislosti se studiem intestinální mikroflóry u dětských pacientů s celiakií [13].

Pro pochopení klinického významu a zejména etiologické souvislosti nejen tohoto druhu je významné zabývat se v mikrobiologických laboratořích přesnou identifikací příslušníků tohoto rodu a všimnout si jejich působení v organismu. Popisy dalších kazuistik mohou následně přispět k objasnění klinického pohledu na *C. imitans* i na další druhy rodu *Corynebacterium*.

Poděkování

Tato práce byla částečně podpořena projektem CZ.1.07/2.3.00/20.0183.

Literatura

1. Funke G, Efstratiou A, Kuklinska D et al. *Corynebacterium imitans* sp. nov., isolated from patients with suspected diphtheria. *J Clin Microbiol.* 1997;35(8):1978–1983.
2. Cazanave C, Greenwood-Quaintance K, Hansen D et al. *Corynebacterium* prosthetic point infection. *J Clin Microbiol.* 2012;50(5):1518–1523.
3. Zakikhany K, Efstratiou A. Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future Microbiol.* 2012;7(5):595–607.
4. Fernández-Natal MI, Sáez-Nieto JA, Fernández-Roblas R et al. The isolation of *Corynebacterium coyleae* from clinical samples: clinical and microbiological data. *Eur J Clin Microbiol Infect.* 2008;27(3):177–184.
5. Funke G, Pagano-Niederer M, Bernauer W. *Corynebacterium macginleyi* has to date been isolated exclusively from conjunctival swabs. *J Clin Microbiol.* 1998;36(12):3670.
6. Ježek P, Petráš P, Horník J. *Corynebacterium macginleyi* – původce konjunktivitidy starší ženy. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha).* 2013;22(7):227–229.
7. Bernard KA, Munro C, Webe D et al. Characteristics of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human material in Canada. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):4375–4381.
8. Švec P, Pantůček R, Petráš P, Sedláček I et al. Identification of *Staphylococcus* spp. using (GTG)₅-PCR fingerprinting. *Syst Appl Microbiol.* 2010;33:451–456.
9. Funke G, Ramos CP, Collins MD. *Corynebacterium coyleae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(1):92–96.
10. Ježek P, Zavadilová J, Lžičařová D et al. Izolace *Corynebacterium coyleae* z hemokultury u pacienta hospitalizovaného na JIP pro cévní mozkovou příhodu. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha).* 2013;22(3):102–105.
11. Riegel P, Ruimy R, DeBriel D, Prevost F et al. *Corynebacterium argentoratense* sp. nov., from the human throat. *Int J Syst Bacteriol.* 1995;45:533–537.
12. Santos MR, Sandhi S, Vogler M, Hanna BA et al. Suspected diphtheria in an Uzbek national: isolation of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* resulted in a false presumptive diagnosis. *Clin Infect Dis.* 1996;22:735.
13. Kopečný J, Mrázek J, Fliegerová K et al. The intestinal microflora in childhood patients with indicated celiac disease. *Folia Microbiol.* 2008;53:214–216.

Méně obvyklá diagnostika závažného průběhu leptospirózy

J. SAGAN¹, L. ROŽNOVSKÝ¹, N. PETEJOVÁ², J. MRÁZEK³, D. VAŇKOVÁ³

¹Klinika infekčního lékařství, Fakultní nemocnice Ostrava, ²Interní klinika, Fakultní nemocnice Ostrava, ³Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum klinických laboratoří

SOUHRN

Sagan J., Rožnovský L., Petejová N., Mrázek J., Vaňková D.: **Méně obvyklá diagnostika závažného průběhu leptospirózy**
Leptospiroza je endemická zoonóza způsobená patogenními spirochetami z rodu *Leptospira*. Většinou se jedná o bezpříznakové infekce, pokud dojde k onemocnění, může se manifestovat chřipkovitými příznaky, obrazem serózní meningitidy, vzácně se rozvíjí hepatorenální selhání při Weilově chorobě. Sérologická diagnostika leptospirózy je většinou pozdní. Uvedena kazuistika 18letého muže se závažným průběhem Weilovy choroby způsobené sérovarem *Icterohaemorrhagiae* s těžkým hepatorenálním selháním, přičemž prvním pozitivním výsledkem byl průkaz patogena metodou polymerázové řetězové reakce v moči.

Klíčová slova: zoonóza, leptospiróza, polymerázová řetězová reakce, moč

SUMMARY

Sagan J., Rožnovský L., Petejová N., Mrázek J., Vaňková D.: **Unusual diagnosis of severe leptospirosis**
Leptospirosis is an endemic zoonosis caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. The infection is mostly asymptomatic; the disease may manifest with flu-like symptoms or as serous meningitis, rarely as hepatorenal failure in Weil's disease. Serologic diagnosis of leptospirosis is mostly relatively late. A case of an 18-year-old man with a serious course of Weil's disease caused by the serotype *L. icterohaemorrhagiae* with severe hepatorenal failure is presented; the first positive result was detection of the pathogen in urine by polymerase chain reaction.

Keywords: zoonosis, leptospirosis, polymerase chain reaction, urine

Klin mikrobiol inf lék 2014; 20(3):102–104

Adresa: MUDr. Jiří Sagan, Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 00 Ostrava-Poruba, email: jiri.sagan@fno.cz

Došlo do redakce: 2. 9. 2014

Přijato k tisku: 17. 10. 2014

Úvod

Leptospiroza je endemicky se vyskytující zoonóza způsobená patogenními spirochetami z rodu *Leptospira* [1]. V posledních 10 letech bylo v České republice hlášeno 269 onemocnění s ročním rozpětím 17–55 případů (zdroj Epidat). Rezervoárem patogenních leptospir jsou hlodavci, kteří jsou infekční po celou dobu svého života a u nichž probíhá infekce většinou asymptomaticky. Přenos se děje přímým nebo nepřímým kontaktem s močí, tkáněmi hlodavců, kontaminovanou vodou a potravinami [2].

Do organismu leptospiry pronikají oděrkami v kůži nebo i neporušenými sliznicemi. Leptospiroza má dvoufázový průběh, v první fázi, po dobu asi 7 dnů, jsou leptospiry přítomny v krvi i mozkomíšním moku, v druhé, tzv. imunitní fázi, trávající až 30 dnů, je možno leptospiry již ke konci prvního týdne onemocnění prokázat v moči [2]. Pro první fázi jsou typické chřipkovité příznaky, pokud se rozvine druhá fáze, rozvíjí se serózní meningitida s bolestmi hlavy a konjunktivitida. U vzácných závažných průběhů obě fáze splývají,

rozwívají se hepatorenální postižení s výrazným ikterem, současně jsou výrazné bolesti svalů, meningální příznaky a konjunktivitida. Nejčastější příčinou smrti je krvácení, např. do plic nebo mozku, nebo multiorgánové selhání [3].

V běžné praxi je většina leptospiróz diagnostikována relativně pozdě pomocí sérologických metod, spolehlivější se jeví metoda mikroaglutinace-lýze ve srovnání s metodou ELISA [4]. U serózních meningitid je možno prokázat původce v mozkomíšním moku metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). U závažných forem je vhodná časná PCR diagnostika v krvi, mozkomíšním moku nebo moči [5].

Uvedena je kazuistika muže s Weilovou chorobou s prvotním průkazem patogena v moči.

Kazuistika

V červenci 2012 byl na standardní oddělení Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava přijat dříve zdravý 18letý muž pro několik dnů trávající lehčí průjemové onemocnění se

zhoršením potíží, s četnými vodnatými stolicemi s horečkou v posledních dvou dnech, u praktického lékaře byla naměřena hodnota C reaktivního proteinu (CRP) 155 mg/l. Při fyzikálním vyšetření dominovala dehydratace a palpační bolestivost lýtek. V úvodních laboratorních výsledcích (viz *tabulka 1*) dominovaly známky akutního selhání ledvin, postižení svalů a hyperbilirubinémie. Pro rozvoj anurie s rychle narůstajícím ikterem byl pacient přeložen na jednotku intenzivní péče. Pro nejasnou etiologii onemocnění s obrazem těžké sepse byla zahájena léčba cefotaximem v dávce 8 g/den s ampicilinem v dávce 12 g/den, dávka antibiotik byla dále upravována dle funkce ledvin. U pacienta byl dodatečně zjištěn údaj o vodáckém kurzu na Vltavě v jižních Čechách, který absolvoval 11 dnů před přijetím a na kterém se opakovaně nechtěně napil říční vody. V den přijetí byla odebrána sérologie na leptospiry, virové hepatitidy a sérologie a PCR na hantaviry. Už druhý den byla vyloučena hantavirová etiologie (sérologie i PCR negativní), ve shodný den byla odebrána krev na PCR diagnostiku leptospirózy (viz *tabulka 2*). Úvodní sérologické vyšetření na leptospiry a rovněž PCR diagnostika ze séra byly negativní. Pátý den hospitalizace byla odebrána moč na stanovení leptospir metodou PCR (in-house PCR) s průkazem DNA *Leptospira* spp. První pozitivní sérologický průkaz leptospirózy byl rovněž z odběru z pátého dne hospitalizace. Pomocí dalších vyšetření byla u pacienta vyloučena virová i bakteriální etiologie průjmu, hemokultury byly opakovaně negativní, Widalova reakce byla negativní, rovněž byly vyloučeny virové hepatitidy A, B, C a E, infekce cytomegalovirem a virem Epstein-Barrův.

Závažný průběh onemocnění přetrvával 6 dnů, zhoršoval se ikterus s rozvojem hepatosplenomegalie, anurie a poté oligurie, s nutností podpory diurézy kontinuálně podávaným furosemidem s maximální dávkou 1 g/den po dobu 5 dnů, koagulopatie se klinicky projevovala mírnou hematurií a epistaxií. Od šestého dne se stav postupně zlepšoval s postupnou normalizací laboratorních parametrů (viz *tabulka 1*). Pacient byl po 15 dnech přeložen na standardní oddělení, cefotaxim byl podáván 12 dnů, ampicilin 15 dnů. Pacient byl propuštěn 19. den hospitalizace v dobrém klinickém stavu s regredujícím subikterem a s normálními hodnotami ledvinných funkcí.

Pacient byl následně třikrát ambulantně vyšetřen, naposled za 22 měsíců od propuštění, současně byl sledován nefrologem. Klinický stav včetně krevního tlaku byl v normě, rovněž laboratorní parametry byly fyziologické. V kontrolní sérologii přetrvávala vysoká hodnota titru protilátek proti sérovarům *Icterohaemorrhagiae* Fryšava a Copenhageni Lebe, ale za 3 měsíce od přijetí nebyla metodou PCR v moči prokázána přítomnost leptospir.

Tabulka 1
Laboratorní parametry u pacienta s leptospirózou ve dnech od přijetí

Parametr (normální hodnoty a jednotky)	1. den	5. den	10. den	13. den	18. den
Leukocyty (3,9–10 × 10 ⁹ /l)	6,7	6,9	8,5		6,0
Hemoglobin (135–175 g/l)	129	122	114	119	
Trombocyty (130–400 × 10 ⁹ /l)	43	26	64		335
Urea (2,8–7,2 mmol/l)	15,2	18,7	18,9	12,3	7,3
Kreatinin (62–115 μmol/l)	292	475	398	84	72
Bilirubin celkový (3,4–2,1 μmol/l)	132	193	255	137	55
Bilirubin konjugovaný (0–4 μmol/l)	82,8	123	166	77	
ALT (0,5–0,75 μkat/l)	0,67	1,14	1,47	1,56	1,44
AST (0,15–0,85 μkat/l)	1,74	4,95	6,1	1,12	0,7
Kreatinkináza (0,15–3,24 μkat/l)	20	77	40	0,45	
Myoglobin (0–70 μg/l)	3 417	10 053	658	31	
Laktát (0,5–2,2 mmol/l)		1,6	0,7	1,2	
CRP (0–10 mg/l)	167	231	185	55	2
Prokalcitonin (0–0,5 μg/l)	33,7	19,9	3,7		
Protrombinový čas (70–130 %)	64	57	94	100	92
APTT (24,7–33,1 s)	55	64	32	36	34
D-Dimery (0–0,5 μg/ml)	3,75	1,53	1,34	1,15	

Tabulka 2
Diagnostika leptospirózy u 18letého muže ve dnech od přijetí

Sérovar	1. den	2. den	3. den	5. den	8. den	18. den	za 3 měsíce	za 7 měsíců	za 22 měsíců
Icterohaemorrhagiae									
Fryšava	negat.		negat.	negat.	negat.	1 : 1 600	1 : 1 600	1 : 1 600	1 : 1 600
Istrica J-20	negat.		negat.	1 : 200	1 : 200	1 : 100	1 : 100	1 : 100	
Sejroe M-84	negat.		negat.	1 : 100	1 : 200	1 : 200	1 : 200	negat.	
Copenhageni Lebe	negat.		negat.	negat.	negat.	1 : 800	1 : 1 600	1 : 1 600	1 : 800
PCR v séru		negat.							
PCR v moči				pozit.			negat.		

Diskuze

U dříve zdravých pacientů s febrilním průběhem a akutním selháním ledvin je nutno v diferenciální diagnostice zvažovat Weilovu chorobu a hantavirózu, pro Weilovu chorobu je navíc typický ikterus. U obou onemocnění je významná epidemiologická anamnéza, zejména přímý či nepřímý kontakt s hlodavci, v naší republice se většinou jedná o autochtonní onemocnění, ale je možné i infikování v zahraničí.

Při leptospiróze dochází k množení leptospir v endotelu malých cév, což vede k jejich poškození, a proto může být v průběhu Weilovy choroby postižen téměř každý orgán, většinou dominuje selhání jater, akutní selhání ledvin, poškození plic, svalové postižení charakteru myozitidy, případně krvácivé projevy [7]. Prognosticky významné jsou hodnoty kreatininu, bilirubinu a myoglobinu. Uvolnění myoglobinu v průběhu myozitidy je patognomické pro leptospirózu a přispívá ke vzniku akutního renálního selhání, což následně alteruje metabolismus bilirubinu s rozvojem enormního ikteru [8].

Sérologická diagnostika leptospirózy je relativně pozdní, což potvrzuje i naše kazuistika, proto je nutné na uvedená onemocnění pomýšlet a správně interpretovat klinické, laboratorní i epidemiologické údaje [1]. U našeho pacienta byl zaznamenán postupný nárůst titrů protilátek vůči více sérovarům, což se označuje jako Finerův fenomén paradoxní aglutinace. Nejvyšší nárůsty byly zaznamenány proti sérovarům Icterohaemorrhagiae Fryšava a Copenhageni Lebe, přesto je možno předpokládat, že onemocnění vyvolal sérovar Icterohaemorrhagiae Fryšava, neboť těžký průběh onemocnění je u sérovaru Copenhageni Lebe raritní.

V časně diagnostice leptospirózy je vhodné upřednostňovat přímé metody, zejména PCR diagnostiku. Jedná se o stanovení DNA leptospir pomocí tzv. real-time PCR ze séra, mozkomíšního moku nebo z moči [6,10]. U našeho pacienta jsme PCR diagnostiku v moči zvolili relativně pozdě, vhodnější je provést stanovení v séru i v moči už v úvodních vyšetřeních.

Antibiotická léčba leptospirózy by měla být zahájena již při prvním podezření na toto onemocnění. Při lehkém průběhu je volbou perorální doxycyklin, při závažném průběhu krystalický penicilin nebo cefalosporiny III. generace, např. ceftriaxon, cefotaxim [2]. Vzhledem k tomu, že onemocně-

ní u našeho pacienta probíhalo pod obrazem těžké sepse, zvolili jsme proto z diagnostických rozpaků kombinaci cefotaximu s ampicilinem. Po ozřejmění původce by byla léčba pouze jedním z antibiotik dostatečná.

V akutním stadiu onemocnění pacient vylučuje leptospiry močí, což může teoreticky ohrozit ošetřující personál a osoby v bližším kontaktu. U pacientů je nutné dodržovat bariérový ošetřovací režim a rovněž je vhodné informovat laboratoř o možné přítomnosti patogena v moči, neboť leptospirurie přetrvává i při antibiotické léčbě [9]. Nebezpečí nozokomiální nákazy je však malé.

Nás pacient měl v moči prokázány leptospiry metodou PCR pátého dne hospitalizace, ale za 3 měsíce od přijetí už bylo uvedené vyšetření negativní. Podle literárních údajů může asymptomatická leptospirurie přetrvávat až jeden rok po onemocnění, nicméně jsou tyto případy raritní, proto je těžké interpretovat, zda je toto významné pro mezilidský přenos onemocnění [10].

Závěr

Přímý průkaz leptospir metodou PCR v séru a současně v moči je vhodný pro časnou diagnostiku leptospirózy. U pacientů s Weilovou chorobou a ostatními leptospirózami je třeba považovat lidskou moč za infekční materiál.

Literatura

- Brueck M, Grepels E, Braig G, et al. Leptospirosis as a differential diagnosis of acute renal failure. *Med Klin (Munich)*. 2002;97(10):614–618.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296–326.
- Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, et al. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Braz J Infect Dis*. 2007;11(1):142–148.
- Kučerová P, Čermáková Z, Polák P, et al. Výskyt leptospirózy v Královéhradeckém a Pardubickém kraji a v části kraje Vysočina v letech 2002–2009. *Klin mikrobiol inf lék*. 2011;17(5):168–172.
- Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perie JL, et al. Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis*. 1997; 25(3):720–724.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, et al. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt.1):45–49.
- Seguro AC, Andrade L. Pathophysiology of leptospirosis. *Shock*. 2013;39(Suppl 1): 17–23.
- Meľnik GV, Avdeeva MG, Piskunov OV. The importance of myoglobin in the pathogenesis of leptospirosis. *Terapevicheski arkhiv*. 1997;69(4):69–72.
- Chow E, Deville J, Nally J, et al. Prolonged Leptospira Urinary Shedding in a 10-Year-Old Girl. *Case reports in pediatrics*. 2012;2012:169013.
- Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, et al. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 1994;32(8):1894–1898.

20. světový kongres – AIDS 2014 (IAC 2014), Melbourne, Austrálie

Ve dnech 20.–25. 7. 2014 se konal 20. světový kongres o AIDS, tentokrát v australském Melbourne, tenistům známém především grandslamovým turnajem Australian Open. Zúčastnilo se ho více než 15 tisíc delegátů a více než tisíc zástupců nejrůznějších médií. Kongres se koná pravidelně po dvou letech a setkávají se při něm pracovníci z různých sfér (vědci v základním a klinickém výzkumu, kliničtí lékaři, zdravotní sestry a jiné osoby pečující o HIV/AIDS osoby, sociologové, psychologové, politici a další), kteří jsou nějakým způsobem zapojeni do péče o HIV pozitivní osoby žijící na jednotlivých kontinentech. Předsednictví na letošním kongresu přijaly prof. Francoise Barré-Sinoussi, prezidentka International AIDS Society, nositelka Nobelovy ceny za medicínu z roku 2008 a prof. Sharon Lewin, za pořádající zemi.

Smyslem AIDS 2014 bylo setkání předních vědců, zdravotnických expertů, politiků, ale i HIV infikovaných osob, společně se podílejících na hledání optimálních preventivních a léčebných přístupů a formování nových strategií a globálních přístupů v boji proti AIDS v kontextu ekonomických možností jednotlivých zemí. Letošní konference se konala v rozsáhlém komplexu kongresového centra na břehu řeky Yarra. Ze 7 300 zaslaných abstraktů bylo komisemi do programu vybráno 2 500 z nich. Abstrakty s nejvyšším skóre byly zařazeny do přednáškových sekcí, ostatní byly přijaty jako postery. Při plenárních přednáškách, workshopech, sympoziích, firemních setkáních, satelitních sekcích a posterových prezentacích se účastníci seznamovali s nejnovějšími poznatky oboru, i oborů příbuzných, vznikaly nové kontakty, nová přátelství, ale také nápady na spolupráci a zlepšení profesionálního růstu. Zdárný průběh konference by však nebyl možný bez dostatečně štědrých sponzorů, finanční a technické podpory vlád a nejrůznějších rad zúčastněných zemí, ale i dalších mezinárodních organizací. O organizaci a bezpečnost účastníků se staralo velké množství profesionálních i dobrovolných pracovníků. Ubytování účastníků bylo zajištěno většinou v nedalekém okolí kongresového centra.

Heslo letošního kongresu „Stepping up the pace“ by se dalo volně přeložit jako zrychlení tempa (míněno v preventivních, léčebných, ale i sociálních přístupech k nemocným) a vyjadřuje naději a optimismus, mobilizaci sil a zdrojů a nezbytné spojení sil v boji proti stále trvající pandemii HIV/AIDS. Logo kongresu (stopy bosých nohou v písku) bylo vybráno v soutěži mladých lidí (zvítězila 22letá autorka z Tanzanie) a znamená zvýšení ostražitosti mladých lidí před HIV. Zvyšující se zodpovědnost jedinců i kolektivů a promptní reakce na současné potřeby nemocných vede ke zpomalení průběhu epidemie. Součinnost vědy, společnosti, organizačních a kontrolních jednotek hraje v praktickém řešení pandemie nejdůležitější roli.

Již před oficiálním zahájením vlastního programu konference probíhala kromě předkongresových sympozií také setkání týmů vědeckých pracovníků řešících většinou globální výzkumné projekty. Podobně jako v minulosti i letos probí-

hal projekt „Global village“ upozorňující na to, že všichni žijeme na jedné planetě Zemi a máme společné problémy. V projektu se představily jednotlivé organizace bojující na různých úrovních proti HIV/AIDS v různých zemích světa, jež upozornily na skutečnost, že jedině společnými silami a důsledně vedenými programy lze nad HIV/AIDS postupně zvítězit. Tento program probíhal během celého kongresu. Vystoupila v něm celá řada umělců z různých zemí světa a bylo promítáno množství instruktivních filmů určených pro různé cílové skupiny osob.

20. 7. 2014 v 19 hodin byl kongres zahájen. Vystoupila řada osobností vědeckého i veřejného života.

Projevem přispěl i premiér státu Victoria a primátor Melbourne. Zahájení kongresu však mělo také vzpomínkový charakter. Počínaje zahájením se celým průběhem kongresu prolínala smutná událost – sestřelení malajského civilního letadla letu MH 17 s následným úmrtím 298 pasažérů, z nichž šest, včetně prof. J. Lange, bývalého předsedy IAS, cestovalo na konferenci.

V průběhu kongresu rovněž vystoupil bývalý prezident USA Bill Clinton, který upozornil na potřebu politické vůle a nutnou mezinárodní spolupráci s dostatečným finančním zajištěním, umožňující zlepšení preventivních opatření a zajištění léčby pro 15 mil. osob do roku 2015. V podobném duchu vystoupil irský zpěvák, hudebník, herec a politický aktivista Bob Geldof.

Řada sponzorských firem zveřejnila nové informace ze svého portfolia léků, určených pro kombinační léčbu HIV/AIDS. Dlouhodobým trendem je simplifikace léčby, tedy sdružení jednotlivých léčebných přípravků (3–4) do jedné tablety podávané jednou denně. Tento přístup je zásadní inovací především pro země s velmi omezenými finančními zdroji.

Úkolem konference bylo:

- inspirovat se, povzbudit a obhajovat spolupráci s postiženými komunitami, politiky, vědci, kliniky a ostatními zájmovými skupinami pracujícími na postupné likvidaci hrozby AIDS systematickými preventivními opatřeními, komplexní péčí a léčbou určenou pro všechny.
- zlepšení informovanosti a porozumění, jež pomůže odstraňovat bariéry, stigmata, diskriminaci a represivní opatření trvající již přes 30 let. V jednotlivých zemích jsou opatření přijímána různě rychle, nezávisle na ekonomické situaci dané země. Někde se snižování počtu nově infikovaných daří, jinde nikoli.
- soustředění se na hlavní postižené skupiny (muži mající sex s muži, sexuální pracovníci, HIV pozitivní osoby, transsexuálové, uživatelé injekčních drog). Je však zřejmé, že mnoho osob dosud o své HIV – pozitivitě neví, a tudíž se neléčí.

V posledních třech desetiletích došlo k řadě zásadních objevů na poli základního a klinického výzkumu, epidemiologie a hlavně léčby infekce HIV/AIDS. Je však nutno neu-

stávat v boji a zajistit další finanční zdroje pro inovaci výzkumných programů. Očekává se zapojení nové generace mladých vědců, osobností veřejného i politického života a obhájců těchto principů.

Nezanedbatelné jsou pokroky v léčbě HIV/AIDS, ale i komorbidit a koinfekcí (např. TBC, virových hepatitid, malárie). Zásadním požadavkem doby však je a bude zajištění všeobecného přístupu k prevenci a léčbě HIV/AIDS. Tyto principy, vycházející z možností evropských zemí a USA, jsou zatím s obtížemi zajišťovány ve většině zemí Afriky, Asie, Oceánie, ale i v některých zemích východní Evropy. Plány jsou vypracovány na roky 2015 a další.

Kongresová jednání se konala nejen ve vlastním kongresovém centru, ale přesouvala se do dalších zařízení ve městě a mnoho doprovodných akcí se odehrávalo i v ulicích Melbourne, které se na tuto významnou akci připravilo speciální výzdobou a každodenním kongresovým televizním zpravodajstvím na kanálu 86.

Spektrum prezentované problematiky bylo nadměrně široké a zajímavé – z mnoha okruhů bych rád upozornil především na:

1. Okruh sociálně – právní: HIV a mládež, HIV a muži mající sex s muži (MSM), výskyt HIV u původního obyvatelstva jednotlivých zemí, HIV, zákony a lidská práva (včetně homofobie), HIV u vězňů, sociální a kulturní kontexty rizik a prevence HIV, sociálně ekonomické otázky u postižených rodin, HIV a uživatelé injekčních drog, zneužívání dětí, financování programů a efektivita současných investic, ekonomická pomoc průmyslových podniků, dostupnost léčby v zemích s omezenými finančními zdroji, kriminalizace HIV v některých zemích, úkoly nevládních organizací a nadací – nové přístupy, sexuálně-reprodukční zdraví, práva žen a dívek s HIV, otázky víry, HIV a sexuálních tabu, mentální zdraví a HIV, HIV a cestování.
2. Okruh základního výzkumu: molekulární diagnostika a techniky analýzy HIV, biomarkery (např. FIB4, APRI), latence infekce HIV a rezervoáry, restriční faktory (např. MARCH8, haplotyp MX2, protein HERC5), nové cíle – neutralizační protilátky, alosterická inhibice, genová terapie, využití „defektních“ HIV, aktivace latentních HIV-1 v rezervoárech in vivo (např. romidepsin), preventivní a terapeutické vakcíny – nové cíle.
3. Okruh epidemiologie: prevence HIV, HIV-testování, cirkumcize jako metoda redukce přenosu HIV, přenos HIV z matky na dítě (MTCT), preexpoziční profylaxe infekce HIV u MSM pomocí kombinace tenofoviru s emtricitabinem.
4. Okruh klinických studií a zkušeností z praxe: nové nadějně léky (např. DTG), zkušenosti s novými fixními kombinacemi léků (např. COP/EVP, STRB) zachování účinnosti léčby, adherence a retence dispenzarizovaných pacientů, cART použitelná v graviditě s cílem redukce MTCT, zlepšení funkce zdravotních systémů v boji proti HIV/AIDS, využití moderních komunikačních technologií v prevenci a léčbě HIV (SMS, e-mail, Tweet, Facebook), orgánová poškození vlivem HIV a nežádoucí účinky léčby (kostní, renální, metabolické, včetně stárnoucí populace) a možnosti jejího ovlivnění, využití dříve používaných antiretrovirotik v nových kombinacích (př. MVC s DRV/r), včetně teoretické možnosti vyléčení HIV/AIDS. Pozornost byla věnována rovněž zajímavým kazuistikám a léčbě jako prevenci šíření HIV v komunitě.
5. Kurzy pro začínající výzkumníky (jak uspět s abstraktem na konferenci, s článkem v časopisu aj.), kurz pro pečovatele o HIV pozitivní osoby, sestry, laboratorní pracovníky, sociální pracovníky, právníky, psychology.

Pro nejširší fórum účastníků byly určeny plenární přednášky, konané v největších sálech, které však ne vždy stačily velkému počtu zájemců, proto byla plenární jednání přenášena televizním okruhem i do dalších „pomocných“ prostor. První den byly prezentovány nové pohledy na epidemiologickou problematiku infekce HIV, život osob s AIDS a současný stav a možnosti terapie HIV/AIDS. Druhý den se témata orientovala na posilování vztahu zdravotních systémů a veřejnosti, otázky infekce HIV ve vztahu k jednotlivým pohlavím (genderová problematika, včetně transsexuálů) a úkolům Globálního fondu pro boj proti AIDS, TBC a malárii. Třetí den byl věnován efektivitě léčkové politiky a redukci následků pandemie HIV, koinfekci HIV a TBC, závěrečná plenární přednáška se zabývala problematikou HIV u sexuálních pracovníků. Čtvrtý den bylo auditorium seznámeno s výsledky nových výzkumů v oblasti HIV vakcín, s novými technologiemi v prevenci HIV a s problematikou MSM a transsexuálů. Pátý, závěrečný den byl věnován naší současné pozici ve vývoji a využití antiretrovirových kombinací, problematice HIV u adolescentů a možnostem jak snižovat riziko nákazy HIV/AIDS u dětí.

Závěrečné shrnutí významu kongresu a rozloučení patřilo opět hlavním pořadatelům. Příští, již 21. kongres IAC se bude konat ve dnech 17.–22. 7. 2016 a hostitelem účastníků bude jihoafrický Durban.

Doc. MUDr. Dalibor Sedláček, CSc.
Infekční klinika, LF UK a FN v Plzni

Dopis redakci

Reaguji na článek **Familiární výskyt botulismu – kazuistika** autorů Ambrožová H. a spol., uvedený v KMIL č. 2, červen 2014, na str. 40–42. V tomto článku autoři uvádějí na str. 41 v kapitole **Diagnostika a léčba**, že průkaz v séru byl proveden biologickým pokusem na myších v Národní referenční laboratoři pro anaerobní nákazy v Ostravě. Naše Referenční laboratoř ČR pro anaerobní bakterie (nikoliv Národní referenční laboratoř pro anaerobní nákazy, jak je uvedeno v článku) nikdy takový průkaz neprováděla. Pokud byly klinické materiály vyšetřovány na průkaz botulotoxinů od pacientů uváděných v článku, tak byly pravděpodobně testovány ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě. Článek rovněž nijak nereflektuje a neuvádí, jaký druh botulotoxinu byl biologickým pokusem na myších prokázán, tedy který ze sérotypů A–G *Clostridium botulinum* byl v testovaných vzorcích přítomen. V případě, že by nebyla prováděná sérotypizace pomocí monovalentních antisér, stačilo by uvedení polyvalentního antiséra, které bylo v biologickém pokusu

použito a na které byl biologický pokus na myších pozitivní. Konstatování autorů práce, že na potvrzení přítomnosti botulotoxinů ve vzorcích od pacientů byl proveden biologický pokus na zvířeti a že byl pozitivní, je naprosto nedostačující. Uhynutí myši mohlo být způsobeno i jinými toxiny než botulotoxiny. To, že diagnostika botulismu byla uvedena v článku v této okleštěné podobě, svědčí i skutečnost, že mezi autory článku nefiguruje nikdo, kdo biologický pokus na zvířeti prováděl a následně interpretoval jeho výsledky.

RNDr. Dittmar Chmelař, Ph.D.
Vedoucí Referenční laboratoře ČR pro anaerobní bakterie
Katedra biomedicínských oborů
Ústav mikrobiologie a imunologie
Lékařská fakulta Ostravské univerzity

Vyjádření autorů k reakci RNDr. Dittmara Chmelaře, Ph.D., na článek **Familiární výskyt botulismu – kazuistika**, uvedeného v KMIL v červnu 2014

Tři pacienti hospitalizovaní v Nemocnici Na Bulovce pro botulismus měli klinické příznaky onemocnění, odpovídala i epidemiologická anamnéza (doma připravená paštika). Proto jsme předpokládali toto onemocnění a požadovali jeho diagnostiku. Diagnostika byla provedena ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě. Dle telefonické informace byla provedena pokusem na myších, nejprve bylo použito polyvalentní sérum a poté dotypování monovalentními séry. Druh botulotoxinu se nepodařilo určit, botulotoxin E byl vyloučen, botulotoxin A a B se nepodařilo rozlišit. V diagnóze botulismu nás utvrdil i terapeutický efekt podaného anti-botulinního séra. Autory kazuistiky jsou klinici, kteří uvedené pacienty léčili; kazuistika měla být původně pouze

součástí článku prof. MUDr. Jiřího Beneše, CSc., uveřejněného ve stejném čísle KMIL a týkajícího se nově zřízené pohotovostní zásoby život zachraňujících antiinfektiv, a jejím účelem nebylo podávat komplexní informace o botulismu. Teprve později bylo rozhodnuto o jejím samostatném uveřejnění.

Za záměnu názvu laboratoře se omlouváme.

Za autory MUDr. Helena Ambrožová, Ph.D.
Klinika infekčních, parazitárních a tropických nemocí
Nemocnice Na Bulovce

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 ze 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 (vyloučení 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, výrobem 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 etikou 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 Lék.* 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